

---

**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE ZOOLOGIA**

---

**GLÂNDULA ECTOMANDIBULAR E  
COMPORTAMENTO DE *Polistes versicolor*  
(OLIVIER) (HYMENOPTERA, VESPIDAE).**

**THIAGO AUGUSTO ORTEGA PIETROBON**

**ORIENTADOR: PROF. DR. FLÁVIO HENRIQUE CAETANO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Zoologia)

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Julho - 2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

595.798 Pietrobon, Thiago Augusto Ortega.  
P626g Glândula ectomandibular e comportamento de *Polistes  
versicolor* (Olivier) (Hymenoptera, Vespidae) / Thiago  
Augusto Ortega Pietrobon. – Rio Claro : [s.n.], 2005  
158 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Flávio Henrique Caetano

1. Vespa. 2. Etograma. 3. Histoquímica. 4.  
Polihedrovirus. 5. Morte celular. 6. Organização social. I. Título

“Se hoje enxergo mais longe  
foi por ter me apoiado  
nos ombros de grandes mestres”  
(adaptado de Isaac Newton)

Dedico a minha mãe Miriam e ao meu pai Celso pelo amor, carinho, apoio e incentivo que me deram. À vocês devo tudo na vida.

A minha irmã Caroline e ao meu irmão Matheus, por tudo de bom que vivemos estes anos. Tenho muito orgulho de ter vocês como irmãos.

E a minha noiva Yara, por estar sempre ao meu lado durante toda esta trajetória. Te amo muito. Te quero para sempre.

Vocês todos continuam sendo a razão maior pela minha busca por dias cada vez melhores.

Dedico todo este trabalho ao meu amigo e orientador Flávio.

Meu eterno muito obrigado

Por fim, dedico aos amigos e companheiros de trabalho Fábio Britto e Thalita Rocha.

Esta tese também é de vocês

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, amigo e orientador, pela orientação que tive desde o início de minha carreira científica.

Aos grandes amigos Fábio Barros Britto e Thalita Rocha, parceiros na excussão deste trabalho, por tudo que passamos juntos. Esta tese não seria o que é agora se não fossem vocês.

Ao departamento de Biologia, na pessoa da Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti, pela utilização dos laboratórios, equipamentos, materiais e pessoal.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Unesp, campus de Rio Claro, na pessoa do Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano.

À professora Dra. Maeli Dal Pai Silva e Sueli Cruz Michelin, do Laboratório de Histoquímica do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu, pelo auxílio e pela utilização de seu laboratório.

Ao amigo Prof. Dr. Fernando José Zara, pelas discussões que tivemos, que muito me valeram para realização deste trabalho.

Aos Professores Doutores Regina Morelli de Moraes, Edilberto Giannotti e Sulene Niroko Shima, pelo que contribuíram para confecção deste trabalho, com as aulas que tive, tirando dúvidas e discutindo resultados.

À Mônica e ao Antônio, técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, ao Gerson e a Rogilene, técnicos dos Laboratórios do Departamento de Biologia Celular, e ao Seu Rui, do jardim experimental, pela ajuda e paciência que comigo tiveram.

Aos colegas de pós-graduação, pela grata convivência.

Aos Mestres, Colegas, Amigos e Familiares por tudo que contribuíram, direta ou indiretamente, para este trabalho.

E a todas as pessoas que de alguma forma também contribuíram para realização deste trabalho.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

	Página
<u>RESUMO</u> .....	1
<u>ABSTRACT</u> .....	3
<u>INTRODUÇÃO</u> .....	5
<u>CAPÍTULO 1</u> : Análise comportamental de <i>Polistes versicolor</i> (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae).....	8
<u>CAPÍTULO 2</u> : Comportamento de machos de <i>Polistes versicolor</i> (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae).....	52
<u>CAPÍTULO 3</u> : Padrões histoquímicos da glândula ectomandibular de <i>Polistes versicolor</i> (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae) e suas relações com idade, comportamento e casta.....	80
<u>CAPÍTULO 4</u> : Morte celular programada na glândula ectomandibular de <i>Polistes versicolor</i> (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae).....	113
<u>CAPÍTULO 5</u> : Presença de partículas virais no núcleo de células epiteliais e hemócitos de <i>Polistes versicolor</i> (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae).....	138
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u> .....	148
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	154



## RESUMO

A espécie *Polistes versicolor* tem se mostrado um excelente modelo para o estudo com vespas eussociais primitivas neotropicais, pela distribuição ampla, número de trabalhos já realizados com ela, tipo de organização social e por pertencer a um gênero considerado chave na compreensão da evolução do comportamento social. O presente trabalho apresenta os resultados do estudo comportamental, associado à análise histoquímica da glândula ectomandibular e à descrição do processo de morte celular programada desta glândula. Apresenta também nota a respeito de infecção viral nas células epiteliais próximas à glândula ectomandibular desta vespa. *Polistes versicolor* apresenta colônia monogínica, em qualquer fase do desenvolvimento colonial. As subordinadas apresentam especialização momentânea, sendo que todos os indivíduos são capazes de desenvolver qualquer atividade, independente de idade ou casta. Os machos apresentam comportamentos de cuidado com a prole e manutenção do ninho, porém em frequências bastante baixas. Os indivíduos de uma colônia podem ser divididos em 3 grupos de acordo com a função que desempenham. Estes grupos são variáveis de acordo com a fase do desenvolvimento da colônia. A glândula ectomandibular de *P. versicolor* apresenta proteínas, lipídios e glicoconjugados neutros, tanto em sua constituição, quanto no produto sintetizado, porém em concentrações que variavam individualmente, de acordo com a fase do desenvolvimento da colônia. A variação dos compostos da secreção pode estar relacionada a

densidade populacional no ninho, de adultas e/ou imaturos. Esta glândula apresenta sinais de início do processo de morte celular em indivíduos entre 20 e 25 dias de idade, apesar de observar-se muitas variações, indicando não haver um ciclo etário rígido. A morte celular programada desta glândula apresenta características apoptóticas e não-apoptóticas, semelhante ao observado em outros insetos adultos. Por fim, descreveu-se aqui um caso de infecção viral em células epiteliais, próximas à glândula ectomandibular, e hemócitos, por *Nucleopolyhedrovirus*, provavelmente oriundo de suas presas, com a discussão de prováveis formas de infecção.

## ABSTRACT

The species *Polistes versicolor* is known as an excellent model for the study of neotropical wasps because of its wide distribution, number of papers on it, kind of social organization and also because the genus *Polistes* is considered essential to the understanding of the evolution of the social behaviour. This work shows the results of behavioural study, associated to histochemical analysis of the ectal mandibular gland and the description of its programmed cell death process. It also presents a note on a viral infection found in the epithelial cells of this wasp. In any phase of its colonial development, *P. versicolor*, shows monoginic colonies. The subordinates present momentary specialization, being all individuals able to develop any activity, independently of their age or caste. The males extend a care behaviour towards the progeny and the nest, however this behaviour is not so frequent. Copulation between possible siblings were observed. The histochemical pattern of ectal mandibular gland evidenced the presence of proteins, lipids and neutral glycoconjugates in concentrations that vary according to the colony development. The variation in the secretion compounds may be related to the population density of adults and/or immature individuals in the nest. Signs of the programmed cell death process were observed in individuals among 20 and 25 days old, although many variations were observed, indicating that there was not a strict age cycle. The programmed cell death characteristic found in this gland renders apoptotical and non-apoptotical features, like observed in different adult insects. Finally, a case of viral infection by *Nucleopolyhedrovirus* in epithelial

cells, near the ectal mandibular gland, and haemocytes, probably derived from its preys, was described with a discussion about probable infection ways.

## INTRODUÇÃO

*Polistes versicolor* é uma das espécies de vespas mais estudadas, dentre os Polistinae tropicais (MAULE-RODRIGUES, 1968; GOBBI, 1977; VALADÃO, 1986; CARNEIRO SILVA, 1991; CONTE e CRUZ-LANDIM, 1997; SOUZA, 1998; ZARA e BALESTIERE, 2000; PIETROBON e CAETANO, 2001, 2003, 2004; DEL LAMA e FERREIRA, 2003; SINZATO e PREZOTO, 2000; ROCHA, 2004; ROCHA e CAETANO, 2003, 2004; BRITTO *et al.*, 2004; BRITTO e CAETANO, 2005; GONZALES *et al.*, 2005). Porém, muito sobre sua biologia ainda permanece desconhecido. Quanto ao comportamento, encontram-se trabalhos que descrevem catálogos dos atos realizados, em diferentes fases do desenvolvimento colonial (ZARA e BALESTIERE, 2000; SINZATO e PREZOTO, 2000), porém sem haver comparações entre tais fases e discutindo pouco a respeito da diversidade funcional das subordinadas, que são tratadas como um grupo único. Assim, como parte dos objetivos do presente trabalho, apresentamos uma análise comportamental de *P. versicolor*, comparando as variações individuais da frequência comportamental, com a idade, casta e fase da colônia, buscando possíveis relações. Visamos também apresentar um etograma dos machos observados, analisando seu papel na vida colonial e o comportamento reprodutivo desta espécie.

Além da descrição comportamental, outro ponto de grande interesse é o controle das interações comportamentais em vespas, principalmente nas espécies primitivamente eussociais. O controle destas interações é, principalmente, mediado por compostos químicos sintetizadas por glândulas

exócrinas, como a glândula ectomandibular de vespas, homóloga à glândula mandibular dos demais Hymenoptera. Apesar de apresentar sua função ainda não completamente esclarecida, as diferentes suposições elegem à glândula ectomandibular as possíveis funções de marcação de território e atração sexual nos machos (WENZEL, 1987), regulação das relações de dominância nas fêmeas (EDWARDS, 1980; DOWNING, 1991) e produção de sinais de advertência para vertebrados (FORTUNATO *et al.*, 2000, 2001). Assim, apesar da função não estar completamente esclarecida, esta glândula parece apresentar significativa importância para organização social destas vespas.

Em abelhas e formigas, com castas definidas, a glândula mandibular apresenta-se com funções diferentes para cada casta, todas de essencial importância na manutenção do comportamento social. A presença de diferentes tipos de secreção da glândula ectomandibular de *P. versicolor*, descrito por Pietrobon e Caetano (2001), dividindo as fêmeas subordinadas em duas possíveis subcastas, poderia representar mais um passo evolutivo da eussocialidade, sendo esta uma espécie com relativa significância para compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos em tal evolução. Como Evans e West-Eberhard (1970) já consideraram, o gênero *Polistes*, por si só, é um grupo chave no estudo da evolução do comportamento social das vespas. Logo, objetivou-se, também, com o presente trabalho, analisar histoquimicamente a glândula ectomandibular de indivíduos de idade, casta e comportamentos definidos, afim de determinar as relações entre tais variáveis e o padrão histoquímico, além de determinar e ciclo secretor desta glândula e avançar mais um passo na elucidação de sua função nesta espécie.

Durante o estudo ultra-estrutural da glândula ectomandibular, observou-se que as células secretoras encontravam-se em diferentes estágios de síntese, sendo que algumas apresentavam características de morte celular programada em determinada fase da vida (PIETROBON e CAETANO, 2004), o que também pode ser evidenciado na análise histoquímica realizada. O estudo da morte celular em insetos adultos, por si só, já é de grande importância, uma vez que a maioria dos trabalhos relacionados à morte celular programada em insetos foi conduzida durante a metamorfose (SILVA de MORAES, 1998), e

que a caracterização deste processo constitui o primeiro passo para compreensão dos diferentes mecanismos que levam à morte das células. Assim, por meio de técnicas histoquímicas e ultra-estruturais propôs-se, também, descrever as características da morte celular natural da glândula ectomandibular de *P. versicolor*, buscando entender suas conseqüentes implicações etológicas-sociais.

Por fim, patologias descritas para vespas adultas são raras na literatura. Desta forma, a identificação de partículas virais nas células epiteliais, próximas a glândula ectomandibular de *P. versicolor*, possibilitou que buscássemos entender os processos e vias de infecção, além da descrição morfológica das células infectadas e do próprio vírus.

## **CAPÍTULO 1**

### **Análise comportamental de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae)**

#### **Resumo**

Poucos são os dados referentes ao comportamento de vespas, porém *Polistes versicolor* destaca-se por ser uma das espécies neotropicais melhor estudadas. Neste trabalho estudou-se o comportamento desta espécie, durante a pós-emergência e o final de ciclo. Novos atos comportamentais foram incluídos no repertório apresentado pela espécie. As subordinadas apresentam especialização momentânea, sendo todos os indivíduos capazes de desenvolver qualquer atividade, independente de idade ou casta. Discute-se ainda métodos de observação e as diferenças entre as fases do desenvolvimento da colônia.

#### **Abstract**

Few data about wasps behavior have been reported, however *Polistes versicolor* stands out being one of the neotropical better studied species. In this work it was studied the behavior of this species, during the post-emergency and the colony decline. New comportamental acts was described for this specie. The subordinates present momentary specialization, being all the individuals



able to develop any activity, independently of their age or cast. It is also discussed the observation techniques and the differences among the colony phases.

## **Introdução**

Vespas do gênero *Polistes* ocorrem em todos os continentes, com exceção das regiões mais frias (RICHARDS, 1978). Estes animais apresentam organização eussocial primitiva, sendo considerado um gênero chave para compreensão da evolução da socialidade (EVANS e WEST-EBERHARD, 1970).

Por várias décadas, pesquisadores tem descrito a divisão de trabalho em vespas sociais primitivas, entretanto, se comparado aos trabalhos com formigas e abelhas, menor atenção tem sido dada a esta questão, em vespas (THERAULAZ *et al.*, 1990).

As pesquisas envolvendo a organização social das colônias de vespídeos podem ser divididas em três abordagens. A primeira foca a diferenciação comportamental pela aptidão de cada membro da colônia, que apresenta grande influência de Pardi (1948) que descreveu a relação hierárquica linear entre os membros da colônia, com divisão de trabalho baseada nesta ordem. A partir daí, diversos trabalhos se baseiam nesta forma de distinção entre castas, quantificando e descrevendo os comportamentos de cada indivíduo (GIANNOTTI, 1999; GIANNOTTI e MACHADO, 1999; ZARA e BALESTIERE, 2000; SINZATO e PREZOTO, 2000). A segunda abordagem, foca mais a distinção morfológica das castas (NODA *et al.*, 2003; SHIMA *et al.*, 2003). Todavia é importante ressaltar que a escolha entre estas duas abordagens leva muito em conta a espécie analisada, uma vez que observamos espécies com clara distinção morfológica mas com diversas limitações para observação comportamental, como alguns Epiponini; enquanto há aquelas espécies em que a distinção morfológica não existe, mas a comportamental é facilmente observada, como em *Polistes* e *Mischocyttarus*. Por fim, uma terceira abordagem, praticamente complementar as duas

primeiras, pode ser listada. Esta relaciona o comportamento dos indivíduos da colônia e, algumas vezes, também a morfologia, com auxílio de análises multivariadas e estatísticas, buscando, principalmente, a organização funcional das castas e os mecanismos sociais que atuam neste sistema (THERAULAZ *et al.*, 1990). Esta última abordagem tem sido, aparentemente, mais explorada no estudo de formigas Ponerinae (GADAGKAR e JOSHI, 1984).

As vespas da espécie *Polistes versicolor* se organizam pela diferenciação de atividades, ovofagia, larvifagia e dominação física, formando uma relação hierárquica linear, com uma das fêmeas tornando-se a dominante enquanto as demais tornam-se subordinadas (PARDI, 1948; GOBBI, 1977).

Indivíduos recém-emergidos apresentam-se, na maior parte do tempo, imóveis, refugiados atrás do ninho, podendo realizar alguns vôos de orientação, durante a primeira semana de vida (ZARA e BALESTIERI, 2000). Após este tempo, começam as atividades de forrageamento de presas, néctar, água e polpa vegetal, além da construção do ninho. As mais velhas têm tendência de participar de trabalhos “domésticos”, como cuidado das larvas, mas não há nenhuma divisão de trabalho bem definida segundo a idade (YOSHIKAWA, 1963).

Existe certa plasticidade comportamental entre os indivíduos, sendo estes capazes de realizar qualquer atividade dentro da colônia. Porém, algumas poucas recém-emergidas podem apresentar desenvolvimento ovariano e vir a ser uma fêmea com alta posição hierárquica, a qual poderá disputar o domínio da colônia ou fundar uma nova colônia em período oportuno (GOBBI, 1977).

Diferenças morfológicas externas, estatisticamente significantes, entre dominantes e subordinadas, não foram encontradas em *P. versicolor* (MAULE-RODRIGUES, 1968; GOBBI, 1977). Para Cumber (1951), outras espécies de *Polistes* e *Mischocyttarus* também não apresentam quaisquer diferenças morfológicas ou variações de cor. Assim, a diferenciação é apenas comportamental.

Isto posto, o presente trabalho traz uma análise comportamental de *P. versicolor*, com a formulação de etograma, análise das relações entre

indivíduos, suas idades e comportamentos realizados, por meio da análise multivariada, comparando estágios diferentes do desenvolvimento colonial e diferentes modos de observação.

### **Material e Métodos**

Ao todo, 10 colônias em período de pós-emergência foram coletadas, nos distritos de Ajapi e Ferraz, município de Rio Claro, e translocadas para a área externa do prédio do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia, da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro (22°24'36" S; 47°33'36" W; aproximadamente 600m acima do nível do mar), onde se realizaram as observações.

As observações ocorreram no período entre janeiro de 2003 e janeiro de 2004. Foram acompanhadas 5 colônias, totalizando 413 indivíduos marcados e 126,6 horas de observações (tab. 1).

Os indivíduos foram marcados com tinta para aeromodelismo atóxica (Testors), sobre o tórax (mesoscuta), numa combinação de até três cores para cada indivíduo, como realizado por Zara e Balestiere (2000). As marcações eram diárias, logo pela manhã, ou algumas horas depois que se observava a emergência de um novo indivíduo. Esta espera de algumas horas foi respeitada sempre que possível pois a marcação imediatamente após a emergência poderia levar a morte do recém-emergido (Zara, Inf. Pess).

Guiados pela marcação, acompanhamos a idade e os comportamentos de cada indivíduo, pelo método *Scanning* (ALTMANN, 1974), com intervalos de 5 minutos. Os dados, referentes ao comportamento de cada indivíduo, eram anotados em uma tabela que compila os comportamentos observados por Zara e Balestiere (2000), em *Polistes versicolor* e Giannotti e Machado (1999), em *P. lanio lanio* (tab.2).

Foram realizadas observações contínuas e descontínuas, afim de se comparar os métodos. Nos ninhos ME1, ME2 e ME3 foram realizadas as observações descontínuas, sendo os dados coletados diariamente, por pelo menos 1 hora, alternando-se os períodos a cada dia. Já nos ninhos ME4 e ME5

as observações ocorreram diariamente, nos períodos de grande atividade, das 9:00 as 12:00 e das 14:00 as 18:00, caracterizando o método contínuo de observação (tab.1).

**Tabela 1.** Ninhos observados, com o período em que ocorreram as observações, o tempo total observado e o método de observação adotado.

<b>Ninho</b>	<b>Período da obs.</b>	<b>Tempo de obs.</b>	<b>Método de obs.</b>
ME1	De 7 a 29/01/03	21,4 hrs	Descontínuo
ME2	De 14 a 26/01/03	09,7 hrs	Descontínuo
ME3	De 9 a 24/04/03	21,4 hrs	Descontínuo
ME4	De 6 a 13/01/04	35,0 hrs	Contínuo
ME5	De 6 a 13/01/04	35,0 hrs	Contínuo

Com os dados obtidos foram montadas tabelas de freqüência absoluta e proporcionais, dos comportamentos de dominantes e subordinadas, para cada ninho e cada estágio do desenvolvimento observado (pós-emergência e final de ciclo). Analisou-se ainda as diferenças encontradas entre os dois métodos de observação, contínua e descontínua, novamente em colônia em pós-emergência e final de ciclo. Por fim, foram realizadas análises multivariadas (análise de componentes principais e confecção de cladogramas, no programa PC-ORD, versão 4.14) para identificação da organização comportamental das subordinadas, que, muitas vezes, constituíam um grupo bastante heterogêneo. A análise multivariada utilizada aqui, foi também utilizada em outros estudos com vespídeos, como em *Ropalidia cyathiformis* (GADAGKAR e JOSHI, 1984), *Polistes dominulus* (THERAULAZ *et al.*, 1990), *Belonogaster petiolata* (KEEPING, 2000) e com polietismo de formigas Ponerinae, como a *Pachycondyla (=Neoponera) apicalis* (FRESNEAU e DUPUY, 1988).

**Tabela 2** Tabela utilizada para computar os atos comportamentais observados no campo (compilada de Zara e Balestiere (2000) e Giannotti e Machado (1999)).

CÓDIGO DO NINHO: \_\_\_\_\_ PERÍODO: \_\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**INDIVÍDUOS**

--	--	--	--

**ATIVIDADE FORRAGEADORA**

Forragem de líquido			
Forragem de presa			
Coleta de fibra vegetal			
Viagem infrutífera			

**ALIMENTAÇÃO**

Trofalaxis adulto-adulto			
Trofalaxis larva-adulto			
Transferir presa de adulto para outro			
Dividir presa com outro adulto			
Mastigar presa			
Receber	Presa		
	Líquido		
	Fibra vegetal		
Oferecer presa para larva			
Oferecer alimento líquido para larva			
Larvifagia			
Ovofagia			

**INSPEÇÃO E MANUTENÇÃO DO NINHO**

Verificar células			
Verificar células esfregando o gáster			
Receber fibra vegetal			
Iniciar nova célula			
Adicionar material à células			
Mastigar fibra vegetal			
Aplicar secreção ao pedúnculo			
Aplicar secreção bucal ao ninho			
Aplicar secreção gastral ao ninho			

**INTERAÇÃO DE DOMINÂNCIA**

Comportamento de dominância	Vibrar gaster		
	Confronto		
	Ataque físico		
Comportamento de subordinação			
Ovipositar			

**OUTROS COMPORTAMENTOS**

Permanecer imóvel no ninho			
Auto limpeza			
allogrooming			
Dar alarme			
Andar no ninho			
Retirar larva sem larvifagia			
Inserir abdome na célula sem botar			

## Resultados e Discussão

### Etograma

Foram observadas 43 categorias comportamentais, agrupadas em 6 classes, descritas a seguir:

#### Comportamentos relacionados ao forrageamento

- (V) Vôo de reconhecimento - é o realizado ao redor ou próximo ao ninho, geralmente por indivíduos jovens, provavelmente servindo como forma de reconhecimento do local, aprendizagem e fortalecimento da musculatura de vôo.
- (FN) Forragem de alimento líquido - quando a vespa sai e retorna ao ninho sem presa, mas realiza trofalaxia com outros indivíduos da colônia.
- (FA) Forragear água - quando a vespa sai e retorna ao ninho sem presa e deposita uma gotícula de água na margem de uma célula ou sobre as pupas. Assim como observado por Zara e Balestieri (2000) este comportamento foi mais freqüente em dias quentes, porém também pode estar relacionado com eventos de construção de ninho.
- (FP) Forragem de presa - quando sai e retorna ao ninho com presa macerada entre as mandíbulas.
- (FV) Coleta de fibra vegetal - quando sai e retorna ao ninho com pelota de fibra vegetal macerada por entre as mandíbulas. Geralmente este indivíduo repartia ou passava a pelota para outros indivíduos. Não raramente, também podia começar a construir células.
- (FI) Viagem infrutífera - quando o indivíduo sai e retorna ao ninho sem nada entre as mandíbulas e não realiza trofalaxia com adultos.

### Comportamentos relacionados a alimentação

- (TA) Trofalaxis adulto-adulto - consiste na transferência oral de regurgitado líquido de um indivíduo adulto para outro. A vespa solicitante geralmente toca com as antenas a cabeça da outra vespa durante a transferência, sendo esta uma possível forma de comunicação entre elas (WEST-EBERHARD, 1969; GIANNOTTI e MACHADO, 1999).
- (TL) Trofalaxis larva-adulto – geralmente, um adulto verificando as células, encontra uma larva, toca ritmicamente com as antenas na entrada da célula (tamborila com as antenas) onde esta se encontra e insere sua cabeça, podendo ficar vários segundos ali. O adulto executa tal comportamento para solicitar uma secreção salivar larval (ZARA e BALESTIERI, 2000) que parece ser nutritiva e bastante atrativa para os adultos (HUNT, 1991). Aparentemente nem todas as larvas oferecem sua secreção, pois enquanto o adulto procura, tamborila em várias células com larvas até encontrar alguma que atenda ao pedido.
- (TP) Transferir presa para adulto – quando alguns indivíduos forrageiros chegam com presa, esta pode ser passada para outro indivíduo que a mastigará ou a oferecerá para as larvas. Tal comportamento está diretamente relacionado ao grau de hierarquia entre os indivíduos envolvidos, com as mais dominantes recebendo o alimento. Ao menos em *Mischocyttarus* existe uma relação positiva entre alimentação, desenvolvimento ovariano e posição hierárquica (MARKIEWICZ e O'DONNELL, 2001). Logo, a ascensão e a manutenção da posição hierárquica podem estar diretamente relacionadas com tais relações tróficas, também em *Polistes*, colocando tais comportamentos em destaque para compreensão da dinâmica organização social deste grupo eussocial pouco derivado.
- (DP) Dividir presa com adulto – da mesma forma que a descrita acima, uma forrageira pode chegar com presa e dividi-la com outro indivíduo.

Entretanto a divisão parece ser mais um evento acidental, quando dois indivíduos seguram uma mesma presa, acabando por dividi-la. Todavia é importante ressaltar que em nenhuma das vezes em que tal evento foi observado, houve agressividade por parte dos indivíduos envolvidos.

- (RP) Receber presa – quando um indivíduo chega ao ninho com presa, rapidamente é interceptado por outras que podem receber parte ou todo macerado. Aparentemente não há contato físico entre os indivíduos, que constitui alguma forma de comunicação entre eles. Após receber a presa, esta é mastigada ou passada para as larvas. Geralmente o indivíduo que a recebe é dominante sobre aquele que a cedeu.
- (MP) Mastigar presa – assim que recebe uma presa, alguns indivíduos ficam com a pelota macerada por entre as mandíbulas. Com o passar do tempo, observa-se que a pelota diminui de diâmetro, conforme esta é macerada, levando a crer que esteja havendo ingestão da presa ou pelo menos, de fluídos deste macerado, uma vez que, segundo Hunt (1991), por uma questão anatômica, as vespas não são capazes de ingerir alimento sólido.
- (PpL) Oferecer presa para larva – quando um indivíduo com presa macerada a oferece para as larvas. Algumas vezes o oferecimento era antecedido por tamborilamento das antenas na célula.
- (LpL) Oferecer alimento líquido para larva – quando o indivíduo oferece para a larva material líquido regurgitado.
- (L) Larvifagia – a vespa insere a cabeça na célula, retira a larva e a macera, sendo depois oferecida às demais larvas. Este comportamento e a ovolivoria parecem estar relacionados a contextos de substituição da dominante (ZARA e BALESTIERI, 2000), escassez de recursos



alimentares (GOBBI, 1977), larvas parasitadas, machucadas ou anômalas (GIANNOTTI, 1992).

#### Comportamentos ligados a construção e manutenção do ninho

- (VC) Verificar células – a vespa caminha pelo ninho inserindo a cabeça por poucos segundos em cada célula.
  
- (VCG) Verificar célula com o gaster – a vespa insere o gaster na célula, porém não se observa a oviposição. Para Zara e Balestieri (2000) este é um comportamento que antecede a oviposição, possivelmente preparando a célula para postura do ovo. Entretanto, pudemos observar tal comportamento independente da postura e algumas vezes sendo realizado por indivíduos subordinados, o que desvincula tais comportamentos. Todavia, a real função da inserção do gaster nas células ainda permanece desconhecida.
  
- (IC) Iniciar nova célula – consiste em adicionar polpa vegetal na periferia do ninho, trabalhando-a com as mandíbulas, dando forma a uma nova célula. Ela é sempre iniciada pelo fundo, para depois erguer-se as paredes. É geralmente realizado pela dominante, que apenas inicia as paredes, o restante, quase sempre, é realizado por subordinadas. Não é raro se observar células iniciadas, com paredes curtas, mas já com um ovo colocado. Este último comportamento também foi observado por Giannotti (1992) e Zara e Balestieri (2000) e parece garantir que nenhuma outra vespa, que não seja a dominante, utilize aquela célula.
  
- (AC) Adicionar material à célula – consiste em trabalhar a polpa vegetal com as mandíbulas, agora moldando as paredes das células já iniciadas. É geralmente realizado pelas subordinadas.

- (DV) Dividir fibra vegetal com outro adulto – ocorre quando alguma forrageira chega com polpa e outra vespa a intercepta no ninho, pegando parte da massa de polpa.
- (RV) Receber fibra vegetal – quando o indivíduo intercepta uma forrageira com polpa e recebe parte ou todo bolo de fibras.
- (MV) Mastigar fibra vegetal – comportamento no qual o indivíduo fica com a massa de fibras entre as mandíbulas processando-a. Acredita-se que neste processo ocorra o acréscimo de secreções orais à polpa, que constituirá o ninho, funcionando como uma liga e tornando-a mais resistente. Landolt e Akre (1979) acreditam que a secreção adicionada seja proveniente da glândula mesomandibular de vespas. Já Downing e Jeanne (1983) consideram a glândula salivar do tórax como a fonte da tal secreção.
- (SOP) Adicionar secreção oral ao pedicelo – na maioria das vezes a secreção aplicada no pedicelo (pecíolo) é a oral, onde as subordinadas esfregam as peças bucais, de cima para baixo. A secreção oral serve como reforço, tornando a área escura, brilhante e rígida (GIANNOTTI, 1992; ZARA e BALESTIERI, 2000). Sua aplicação parece ser bastante comum em outras vespas (WEST-EBERHARD, 1969; JEANNE, 1972; DOWNING e JEANNE, 1983; ZARA e BALESTIERI, 2000). A origem da secreção ainda não está clara, sendo que Downing e Jeanne (1983) colocam a glândula salivar do tórax com provável fonte desta secreção, a mesma adicionada à polpa vegetal antes da construção.
- (SON) Aplicar secreção oral ao ninho – Assim como no pecíolo, ocorre a aplicação da secreção na região posterior do ninho, principalmente próximo ao pedicelo. Foi comum observar indivíduos aplicando tanto no pedicelo como na porção posterior do ninho, podendo ser, portanto, considerado como um comportamento único. A função é provavelmente

a mesma que no pecíolo, fortalecer a ligação do ninho com o substrato, mas pode também estar relacionada a impermeabilização do favo.

- (SGP) Adicionar secreção gastral ao pedicelo – As vespas esfregam a região distal do abdome no pedicelo. A aplicação de secreções gastrais ao pedicelo também foi observada em *Mischocyttarus* (JEANNE, 1972) e em algumas *Polistes* (TURILLAZZI e UGOLONI, 1979; ZARA e BALESTIERI, 2000). Acredita-se que as secreções abdominais aplicadas funcionam, principalmente, como repelente de formigas (ESPELIE e HERMANN, 1990).
- (SGN) Aplicar secreção gastral ao ninho – Diferente da anterior, a aplicação de secreção gastral no ninho ocorria independente da aplicação no pedicelo ou de secreções orais. Ocorria principalmente na face posterior do ninho.
- (SP) Aplicar secreção oral sobre as pupas – consiste em esfregar as peças bucais sobre a cobertura de seda que as larvas tecem para fechar a célula, quando vão se empupar. Este foi um comportamento pouco freqüente, porém pode-se observar que as pupas mais velhas apresentam esta cobertura mais escura que as recém empupadas. O mesmo foi observado em *P. lanio* (GIANNOTTI e MACHADO, 1999), entretanto os autores acreditam ser aplicada a mesma secreção usada para reforçar o pedicelo, o que não podemos afirmar com as informações que apresentamos.
- (V) Ventilar o ninho – quando a vespa bate as asas sem alçar vôo, provocando um deslocamento de ar usado para resfriar o ninho. Tal comportamento está diretamente relacionado à elevação da temperatura ambiente (GIANNOTTI e MACHADO, 1999).

- (AI) Dar alarme – consiste em suspender o corpo sobre as pernas, abrir as asas e se voltar para a fonte de distúrbio. Este levantamento do corpo serve para intimidar o agressor pelo aumento do tamanho. Podem também bater as asas durante poucos segundos, que, em grupo e por repetidas vezes, produz um som grave característico. Não era raro observar que os indivíduos após o estado de alarme ficavam em alerta, estáticos, voltados para fonte de distúrbio, porém com uma das pernas dianteiras levantadas e com o último segmento tarsal vibrando. Este último comportamento ainda não foi observado em outras espécies e, apesar de não se observar um contato do tarso com o ninho, poderia ser interpretado como uma forma de comunicação, provavelmente sonora, assim como o tamborilamento das antenas.
- (LC) Limpar célula – consiste na retirada dos restos do casulo de uma pupa para reutilização da mesma célula. A reutilização de células parece ser um comportamento comum, que pode ser inferido pelo número de mecônios observados em cada célula. Carneiro Silva (1991) chegou a encontrar células utilizadas para o desenvolvimento de até 3 indivíduos.
- (AC) Por água nas células – realizado pela vespa forrageira que retorna ao ninho com uma gotícula de água entre as mandíbulas ou no papo, sendo esta gotícula depositada na margem de uma célula. Apesar de tal comportamento estar relacionado ao resfriamento do ninho, como observado por Zara e Balestieri (2000), também pode estar relacionado com a construção do mesmo, como já mencionado anteriormente.

#### Interações de dominância e subordinação

- (D) Comportamento de dominância – É caracterizado por uma interação física, onde a vespa dominante ataca outra, mordiscando e puxando as antenas, pernas e asas. A dominante pode ainda subir no dorso da subordinada e tentar ferroá-la.

- (S) Comportamento de subordinação – a subordinada aceita as agressões por parte da dominante, ficando abaixada, com a cabeça e corpo colados ao ninho. Não é raro se observar subordinadas se afastando do caminho da dominante e até mesmo saindo do ninho para evitá-la.
- (Ov) Ovopositar – a fêmea insere o abdome em uma célula vazia e coloca o ovo no fundo desta. Segundo Zara e Balestieri (2000) ocorre a preparação da célula com a fêmea introduzindo o gaster e efetuando vários movimentos laterais, inspecionando-a e realizando auto-limpeza para só então botar. Entretanto, como já relatado anteriormente, consideramos esta preparação como um comportamento a parte, por ser realizado independente da ovipostura, podendo representar também uma forma de escolha da melhor célula.
- (VG) Vibrar o gaster – enquanto caminha na face anterior do ninho a vespa mantém seu abdome suspenso, erguido e vibra-o de um lado para o outro. Este é um comportamento tipicamente das dominantes (ZARA e BALESTIERI, 2000), estando, provavelmente, relacionado a liberação de feromônios (WEST-EBERHARD, 1969).
- (Cf) Confronto – ocorre quando o indivíduo atacado não se subordina e a interação se torna mais violenta. Ambos ficam com o par de pernas dianteiras levantadas, uma tentando segurar, morder e até mesmo ferroar a outra. Não raramente, os dois indivíduos “se abraçavam”, uma tentando ferroar a outra, perdendo a sustentação e resultando em quedas do ninho. Este último comportamento em especial, também observado em outras espécies, foi chamado “falling-fight”, por West-Eberhard (1969).

### **Comportamentos ligados a reprodução**

- (Cp) Cópula – o macho aproxima-se da fêmea, antenando com ela e realizando “allogrooming”. Este assume então uma posição lateral a

fêmea e sobe em seu tórax com as pernas dianteiras, virando o gaster por debaixo dela. A fêmea levanta levemente seu gaster, facilitando para o macho parear as aberturas genitais. O macho, então, projeta seu aparelho reprodutor e o encaixou na abertura da fêmea. O macho projeta e retrai o aedeagus 6 vezes. Sem mudar de posição, dá uma pausa de poucos segundos e repete os mesmos movimentos mais 6 vezes, para então liberá-la.

- (FC) Fugir da cópula – enquanto o macho aproxima-se da fêmea, antenando e realizando “allogrooming”, a fêmea aceita sua investida, porém quando fica pareado com a mesma e tenta subir em seu dorso com as pernas dianteiras, a fêmea sai andando, sem deixar o macho realizar a cópula. Em nenhuma das vezes em que houve uma tentativa de cópula, observou-se agressão por ambas as partes.

#### Inatividade

- (Im) Imóvel – o indivíduo fica, aparentemente, estático, sobre o ninho. Este comportamento ocorre com maior frequência na região posterior do ninho.

#### **Atividades não específicas ou sem função conhecida**

- (Alo) “Allogrooming” – uma vespa lambe a outra, principalmente na região da cabeça e tórax. Tal comportamento já foi observado em *P. versicolor* (CARNEIRO SILVA, 1991) e *P. ferreri* (SINZATO *et al.* 2003). Para Sinzato *et al.* (2003) um indivíduo é apenas limpo por outro, neste processo, sugerindo uma interação social. Carneiro Silva (1991) já acredita que o “allogrooming” sirva para impregnar os indivíduos com o odor da colônia. Em Vespinae, tal comportamento também está relacionado a passagem de feromônios (EDWARDS, 1980). Algumas espécies de *Vespa* antenam e lambem o corpo da rainha de suas colônias, para captarem a substância de rainha, sendo um comportamento muito similar a corte real das abelhas (MATSUURA,

1984). Por fim, pouco ainda se sabe sobre o papel de tal comportamento em espécies primitivamente eussociais, como em *Polistes*.

- (An) Andar – a vespa anda no ninho ou, muito raramente, no substrato, sem realizar qualquer atividade aparente, que não seja para se deslocar de um ponto para outro.
  
- (RL) Retirar larva sem larvifagia – A vespa insere a cabeça na célula, retira a larva e simplesmente a joga fora do ninho. Provavelmente tal comportamento esteja relacionado a parasitismo ou mal formação (GIANNOTTI, 1992). Diferente de *P. versicolor*, Giannotti e Machado (1999) observaram que em *P. lanio* após retirar a larva o indivíduo saía voando com ela para jogá-la longe.
  
- (AL) Auto limpeza – a vespa se limpa passando as pernas pelo corpo, antenas, uma contra as outras e lambendo as pernas anteriores. Não há sincronia entre as regiões a serem limpas (ZARA e BALESTIERI, 2000). É um comportamento muito executado por todas as vespas. Nas regiões sensoriais a auto limpeza é facilmente entendida como uma forma de manter desobstruídas as áreas receptoras. Talvez no restante do corpo, além da limpeza propriamente dita, esteja relacionado, de alguma forma, com a manutenção e o espalhamento de ferômonios e hidrocarbonetos cuticulares pelo corpo.
  
- (Tam) Tamborilar com as antenas – observado, principalmente, enquanto o indivíduo verifica as células, tocando ritmicamente com as antenas na margem das mesmas, provavelmente, como uma forma de comunicação. O tamborilamento com as antenas antes da alimentação, também foi observado por Zara e Balestieri (2000) e pode ser considerado uma forma de comunicação, entre larvas e adultos (PRATTE e JEANNE, 1984).

Os comportamentos observados em *P. versicolor* são muito semelhantes aos observados por outros autores para mesma espécie (GOBBI, 1977; ZARA e BALESTIERI, 2000) e para outras espécies de *Polistes* (GIANNOTTI, 1992; GIANNOTTI e MACHADO, 1999).

Dos comportamentos observados por Zara e Balestieri (2000) e Gobbi (1977), em *P. versicolor*, apenas a ovofagia não foi relatado aqui. Estes mesmos autores colocam tal comportamento como raro e observado apenas nos períodos de substituição de dominante, tendo sido constatado principalmente por meios indiretos, como o mapeamento dos ovos, larvas e pupas, o que não foi realizado aqui.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram observadas colônias em diferentes fases do desenvolvimento, o que implica em variações entre elas. Afim de minimizar tais variações dividimos os resultados em colônias em pós-emergência e final de ciclo, como colocado a seguir.

### **Colônias em pós-emergência**

Foram observadas 3 colônias (ME1; ME2 e ME4) em pós-emergência em que as freqüências comportamentais de cada casta pouco variavam entre os ninhos (tab. 3).

Entre as causas para as diferenças encontradas, a que mais se destacou foi a variação na hierarquia de dominância. No ninho ME2, por exemplo, a dominante apresentava-se mais agressiva, com alta taxa de postura de ovos e permanecendo muito ativa, apesar de não forragear (tab.3). Acreditamos se tratar, neste caso, de uma dominante substituta, que a pouco havia assumido esta posição e ainda encontrava-se em processo de imposição de sua nova condição. Isto também foi observado por Gobbi (1977), que relata agressividade entre as possíveis novas dominantes em colônias de *P. versicolor*. De qualquer maneira, a substituição é um processo normal, comum e que muitas vezes garante a continuação do desenvolvimento da colônia (CARNEIRO SILVA, 1991).



**Tabela 3** Freqüências comportamentais, comparando dominantes e subordinadas, em 3 colônias de *Polistes versicolor* em pós-emergência.

	ME1		ME2		ME4	
	Dom.	Subor.	Dom.	Subor.	Dom.	Subor.
Saiu para forragear	0,52	5,54	0	2,73	1,57	4,2
Forragem de líquido	0,26	2,93	0	1,28	0	1,87
Forragem de presa	0	0,54	0	1,12	0	0,68
Coleta de fibra vegetal	0	0,77	0	0,48	0	0,86
Viagem infrutífera	0,26	1,26	0	1,12	1,57	0,57
Trofalaxis adulto-adulto	1,84	4,68	0	2,89	1,31	2,28
Trofalaxis larva-adulto	3,67	4,19	4,39	5,14	3,66	2,86
Transferir presa de adulto p/ outro	0	0,09	0,88	1,12	0	0,26
Dividir presa com outro adulto	0,26	0,41	0	0,64	0	0,46
Mastigar presa	0,79	0,81	1,75	1,44	0,52	0,79
Receber presa	0,79	0,81	1,75	0,8	0,79	1,23
Receber líquido	1,31	1,53	0,88	1,28	1,57	1,47
Oferecer presa para larva	0,52	1,31	1,75	1,61	0,79	1,05
Oferecer alimento líquido p/ larva	0,52	1,13	0	0,48	0,52	0,9
Larvifagia	0	0	0	0	0	0,04
Verificar células	11,29	5,36	15,79	6,58	13,87	4,02
Verificar células esfregando o gáster	0	0	0	0	0	0,02
Iniciar nova célula	0	0,09	0	0	0,52	0
Adicionar material à célula	0,79	2,61	0	1,28	1,05	1,63
Dividir fibra com outro adulto	0	0,59	0	0,64	0	0,46
Receber fibra vegetal	0,26	1,08	0	0,64	0,79	0,92
Mastigar fibra vegetal	0,52	0,41	0	0,48	0	0,15
Aplicar secreção ao pedúnculo	0	0,36	0	0,48	0	0,51
Aplicar secreção bucal ao ninho	0,79	0,14	0,88	0,64	0	1,05
Aplicar secreção gastral ao ninho	0,26	0,5	0,88	0,16	0	0,13
Limpar células	0	0	0	0	0	0,04
Pôr água nas células	0	0	0	0	0	0,07
Ventilar o ninho	0	0,05	0	0	0	0
Vibrar o gáster	16,27	3,02	19,3	1,44	8,12	1,54
Confronto	0	0,18	0	0	0,26	0,04
Ataque físico	1,05	0,54	3,51	0,64	1,05	0,68
Comportamento de subordinação	0	0,86	0	1,44	0	0,94
Ovipositar	1,05	0	3,51	0	0,79	0
Permanecer imóvel no ninho	39,4	44,03	28,94	49,49	56,80	66,11
Auto limpeza	8,66	5,58	7,02	4,33	2,36	0,68
Allogrooming	0	0,09	0	0,16	0	0,02
Dar alarme	0,26	1,89	0	0,64	0	0
Andar no ninho	8,66	6,62	8,77	8,83	1,83	1,47
Retirar larvas, sem larvifagia	0	0	0	0	0,26	0
Soma	100	100	100	100	100	100

Desta maneira, pode-se concluir que a diversidade de comportamentos observados não implica em erros, mas sim em uma visão mais geral das adaptações comportamentais para situações particulares da vida em colônias pós-emergente de *P. versicolor*. Os dados gerais de comportamento das fêmeas de colônias em pós-emergência de *P. versicolor*, diferenciando-se dominantes e subordinadas, encontram-se organizados na tabela 4.

### **Colônias em final de ciclo**

Duas colônias (ME3 e ME5) foram observadas em final de ciclo e algumas variações puderam ser observadas entre elas (tab.5). Tais diferenças parecem estar relacionadas, em parte, às condições climáticas e, por outro lado, à imponentia da dominante do ninho ME3.

Quando compara-se os dois ninhos observados, pode-se notar que comportamentos como coleta e processamento de presas, pelas subordinadas do ninho ME3, apresentavam freqüências muito baixas, quando comparadas com as do ninho ME5, e inversamente, comportamentos como coleta de alimento líquido, trofalaxia com adultos e larvas, e verificar células, foram muito realizados. Tais diferenças, quando comparadas com a época do ano em que as colônias foram observadas (abril para ME3 e janeiro para ME5), podem estar refletindo a baixa disponibilidade de presas em abril, em relação a janeiro, resultando na maior exploração de outras fontes nutricionais, como os alimentos líquidos coletados (néctar e exudados) e a solicitação de saliva larval, como relatado.

Observou-se ainda diferenças entre os comportamentos das dominantes, onde no ninho ME3 a dominante ainda possuía controle sobre as demais, visto que atividades de construção, oviposição e dominação física apresentavam freqüências altas em relação ao ninho ME5, onde tais comportamentos haviam cessado e a dominante já apresentava comportamentos de subordinação quando desafiada por determinados indivíduos.

**Tabela 4** Catálogo comportamental comparativo entre dominantes (n = 3) e subordinadas (n = 159) de *Polistes versicolor*, em colônias em pós-emergência.

Comportamentos	Dominantes		Subordinadas <sup>a</sup>	
	N	%	N	%
Saiu para forragear	8	0,91	331	4,48
Forragem de líquido	1	0,11	158	2,14
Forragem de presa	0	0	50	0,68
Coleta de fibra vegetal	0	0	59	0,8
Viagem infrutífera	7	0,8	61	0,82
Trofalaxis adulto-adulto	12	1,37	226	3,06
Trofalaxis larva-adulto	33	3,76	255	3,45
Transferir presa de adulto p/ outro	1	0,11	21	0,28
Dividir presa com outro adulto	1	0,11	34	0,46
Mastigar presa	7	0,8	63	0,85
Receber presa	8	0,91	79	1,07
Receber líquido	12	1,37	109	1,47
Oferecer presa para larva	7	0,8	87	1,18
Oferecer alimento líquido p/ larva	4	0,46	69	0,93
Larvifagia	0	0	2	0,03
Verificar células	114	13	343	4,64
Verificar células esfregando o gáster	0	0	1	0,01
Iniciar nova célula	2	0,23	2	0,03
Adicionar material à célula	7	0,8	140	1,89
Dividir fibra vegetal com outro adulto	0	0	38	0,51
Receber fibra vegetal	4	0,46	70	0,95
Mastigar fibra vegetal	2	0,23	19	0,26
Aplicar secreção ao pedúnculo	0	0	34	0,46
Aplicar secreção bucal ao ninho	4	0,46	55	0,74
Aplicar secreção gastral ao ninho	2	0,23	18	0,24
Limpar células	0	0	2	0,03
Pôr água nas células	0	0	3	0,04
Ventilar o ninho	0	0	1	0,01
Vibrar o gáster	115	13,11	146	1,97
Confronto	1	0,11	6	0,08
Ataque físico	12	1,37	47	0,64
Comportamento de subordinação	0	0	71	0,96
Ovipositar	11	1,25	0	0
Permanecer imóvel no ninho	400	45,62	4295	58,07
Auto limpeza	50	5,7	182	2,46
Allogrooming	0	0	4	0,05
Dar alarme	1	0,11	46	0,62
Andar no ninho	50	5,7	269	3,64
Retirar larvas, sem larvifagia	1	0,11	0	0
Soma	877	100	7396	100

**Tabela 5** Freqüências comportamentais, comparando dominantes e subordinadas, em 2 colônias de *Polistes versicolor* em final de ciclo.

Comportamentos	ME3		ME5	
	Dom.	Subor.	Dom.	Subor.
Saiu para forragear	4,79	2,94	7,69	4,09
Forragem de líquido	0	3,63	0	0,77
Forragem de presa	0	0,15	0	0,66
Coleta de fibra vegetal	0,68	0,03	0	0
Viagem infrutífera	4,11	1,29	4,2	1,97
Trofalaxis adulto-adulto	2,74	6,49	1,4	1,43
Trofalaxis larva-adulto	4,79	1,55	3,5	2,54
Transferir presa de adulto p/ outro	0	0,08	0,7	0,35
Dividir presa com outro adulto	0	0,03	0	0,31
Mastigar presa	0	0	4,2	0,62
Receber presa	0	0,15	2,1	0,69
Receber líquido	2,05	2,21	0,7	0,19
Oferecer presa para larva	0	0,03	1,4	0,35
Oferecer alimento líquido p/ larva	0	0,9	0	0,42
Larvifagia	0	0,18	0	0,31
Tamborilamento com antenas	0	0	0,7	0,19
Verificar células	0	0	8,39	5,44
Verificar células esfregando o gáster	11,64	2,21	0	0,15
Adicionar material à célula	1,37	0	0	0
Dividir fibra vegetal com outro adulto	0	0,03	0	0
Mastigar fibra vegetal	0	0,05	0	0
Aplicar secreção ao pedúnculo	0	0	0	0,42
Aplicar secreção bucal ao ninho	0	0,21	1,4	1,16
Aplicar secreção gastral ao ninho	0	0,08	0	0,31
Aplicar secreção oral sobre as pupas	0,68	0,05	0	0,08
Destruir células	0	0	0	0
Limpar células	1,37	0	0	0,19
Vibrar o gáster	1,37	0,1	8,39	2,62
Confronto	0	0,21	0,7	0,12
Ataque físico	18,49	2,63	11,19	1,5
Comportamento de subordinação	0	4,69	0	2,27
Ovipositar	2,05	0,03	0	0,08
Permanecer imóvel no ninho	37,02	66,88	34,25	63,44
Auto limpeza	2,74	0,82	6,29	4,05
allogrooming	0	0,21	2,8	1
Dar alarme	0	0,03	0	0,85
Andar no ninho	4,11	2,06	0	1,43
Retirar larvas, sem larvifagia	0	0,05	0	0
Inserir abdome na cél. sem botar	0	0	0	0
Soma	100	100	100	100

**Tabela 6** Catálogo comportamental comparativo entre dominantes (n = 2) e subordinadas (n = 31) de *Polistes versicolor* de colônias em final de ciclo.

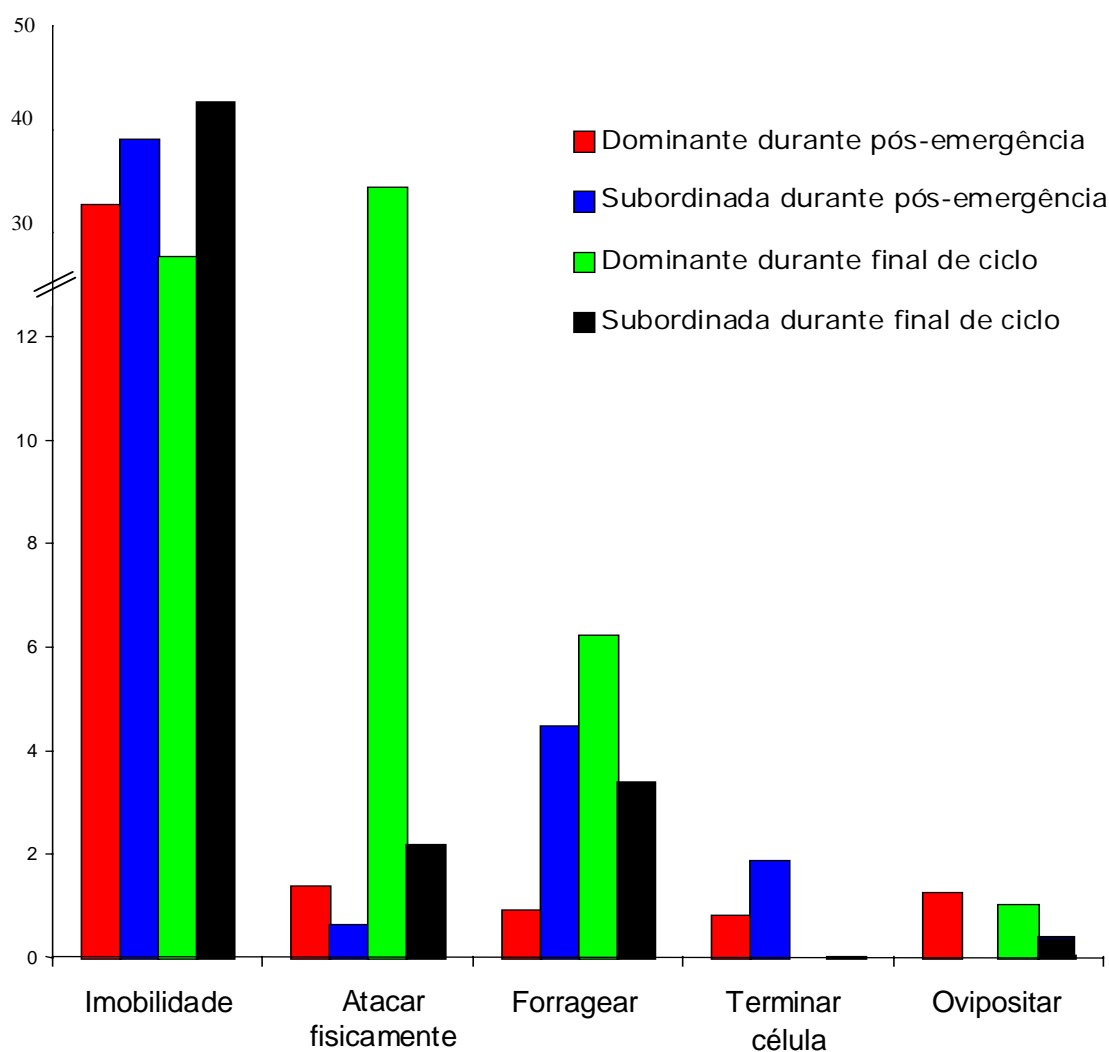
Comportamentos	Dominantes		Subordinadas	
	N	%	N	%
Saiu para forragear	18	6,23	220	3,4
Forragem de líquido	0	0	161	2,49
Forragem de presa	0	0	23	0,36
Coleta de fibra vegetal	1	0,35	1	0,02
Viagem infrutífera	12	4,15	101	1,56
Trofalaxis adulto-adulto	6	2,08	289	4,46
Trofalaxis larva-adulto	12	4,15	126	1,95
Transferir presa de adulto p/ outro	1	0,35	12	0,19
Dividir presa com outro adulto	0	0	9	0,14
Mastigar presa	6	2,08	16	0,25
Receber presa	3	1,04	24	0,37
Receber líquido	4	1,38	91	1,4
Oferecer presa para larva	2	0,69	10	0,15
Oferecer alimento líquido p/ larva	0	0	46	0,71
Larvifagia	0	0	15	0,23
Tamborilamento com antenas	1	0,35	5	0,08
Verificar células	29	10,03	227	3,5
Verificar células esfregando o gáster	0	0	4	0,06
Iniciar nova célula	2	0,69	0	0
Adicionar material à célula	0	0	1	0,02
Receber fibra vegetal	0	0	2	0,03
Aplicar secreção ao pedúnculo	0	0	19	0,29
Aplicar secreção bucal ao ninho	2	0,69	33	0,51
Aplicar secreção gastral ao ninho	1	0,35	10	0,15
Aplicar secreção oral sobre as pupas	0	0	2	0,03
Limpar células	2	0,69	5	0,08
Vibrar o gáster	14	4,84	72	1,11
Confronto	1	0,35	11	0,17
Ataque físico	43	14,88	141	2,18
Comportamento de subordinação	0	0	241	3,72
Ovipositar	3	1,04	3	0,05
Permanecer imóvel no ninho	103	35,63	4244	65,5
Auto limpeza	13	4,5	137	2,12
Allogrooming	4	1,38	34	0,52
Dar alarme	0	0	23	0,36
Andar no ninho	6	2,08	117	1,81
Retirar larvas, sem larvifagia	0	0	2	0,03
Inserir abdome na cél. sem botar	0	0	0	0
Soma	289	100	6477	100

Todavia, o final de ciclo parece ser mesmo um momento conturbado em relação a estrutura social da colônia (MAULE-RODRIGUES, 1968; GOBBI, 1977), o que pode ser notado pela desorganização da divisão de trabalho entre as castas. A tabela 6 reúne as freqüências comportamentais de dominantes e subordinadas em colônias em final de ciclo.

### Comparação entre as colônias em pós-emergência e final de ciclo

Quando compara-se estes dois momentos distintos do desenvolvimento colonial, pode-se notar algumas diferenças comportamentais entre os indivíduos (Fig.1).

**Figura 1** Gráfico comparativo dos comportamentos de maior variação, entre dominantes e subordinadas de colônias em pós-emergência e final de ciclo de *Polistes versicolor*.



No final de ciclo a dominante sai mais freqüentemente para forragear, apesar de raramente retornar com presa ou líquido para colônia, passa a sofrer mais ataques por parte das subordinadas, que nascem cada vez mais aptas a dominar a colônia, mas também se tornam mais agressivas para suprimir estas subordinadas. Elas ainda reduzem a taxa de construção, o que é acompanhado pelas subordinadas, e começa haver maior taxa de oviposição das subordinadas, em detrimento do mesmo comportamento entre as dominantes.

Segundo Maule-Rodrigues (1968) a desorganização observada está relacionada ao número de indivíduos que vão desenvolvendo seus ovários, a medida que a colônia cresce. Porém, esta produção de “rainhas típicas” no final do ciclo é extremamente danosa para a colônia (GOBBI, 1977), uma vez que desestrutura a organização social e força o abandono da colônia. Apesar disso, o surgimento destas fêmeas com ovários desenvolvidos permite a produção de machos, a partir de ovos não fecundados, o que possibilita às futuras fundadoras serem fecundadas, criando condições para que formem suas próprias colônias.

### **Polietismo durante a pós-emergência**

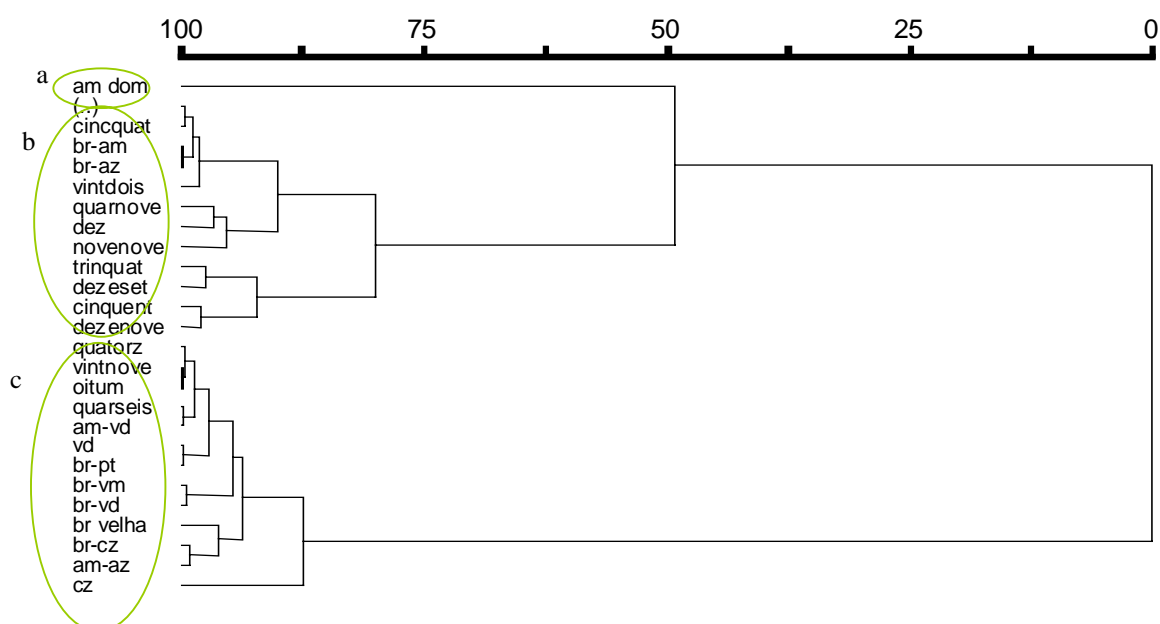
Por ser uma espécie eussocial primitiva, a vespa *P. versicolor* não apresenta distinção morfológica entre as castas (MAULE-RODRIGUES, 1968; GOBBI, 1977) e organiza-se pela diferenciação comportamental, formando uma relação hierárquica linear (PARDI, 1948; GOBBI, 1977). Desta forma, a maioria dos trabalhos de análise comportamental destas vespas, distinguem apenas a dominante das subordinadas, não levando em conta a heterogeneidade funcional do grupo das subordinadas, o que em espécies mais derivadas torna-se evidente a ponto de poder ser dividido em subcastas funcionais. De fato, apesar da diferença entre as castas de Polistinae serem menos conspícuas que em Vespinae, a combinação de características morfo-fisiológicas e comportamentais pode ser bastante complexa.

Utilizando-se da análise multivariada, para montagem de cladogramas e representações gráficas, pela análise de componentes principais (PCA),

podemos observar algumas relações em comum entre os ninhos em pós-emergência, que evidencia a organização funcional, para manutenção da colônia, entre as subordinadas.

Os ninhos ME1, ME2 e ME4, encontravam-se em pós-emergência, diferindo apenas quanto ao número de indivíduos que compunham cada colônia, ao tipo e tempo de observação realizada, fatores estes significativos quanto às diferenças observadas entre eles, como veremos adiante.

**Figura 2** Dendrograma dos indivíduos da colônia ME1, agrupados de acordo com a freqüência de realização dos comportamentos.



Leg. Dominante (a); Grupo de subordinadas próximas à dominante, quanto aos comportamentos executados (b); Subordinadas forrageiras ou que realizavam atividades diferentes das realizadas pela dominante (c).

No ninho ME1, a montagem de um cladograma dos indivíduos, de acordo com a freqüência dos comportamentos que realizavam, mostrou 3 grupamentos de indivíduos (fig.2). O primeiro formado apenas pela dominante, o segundo composto pelos indivíduos subordinados que realizavam algum tipo de trabalho para colônia e que estavam mais relacionados às dominantes, e o terceiro por indivíduos subordinados, porém que não realizavam ou realizam poucas atividades na colônia e os que apresentaram comportamentos não realizados pela dominante, como subordinação.

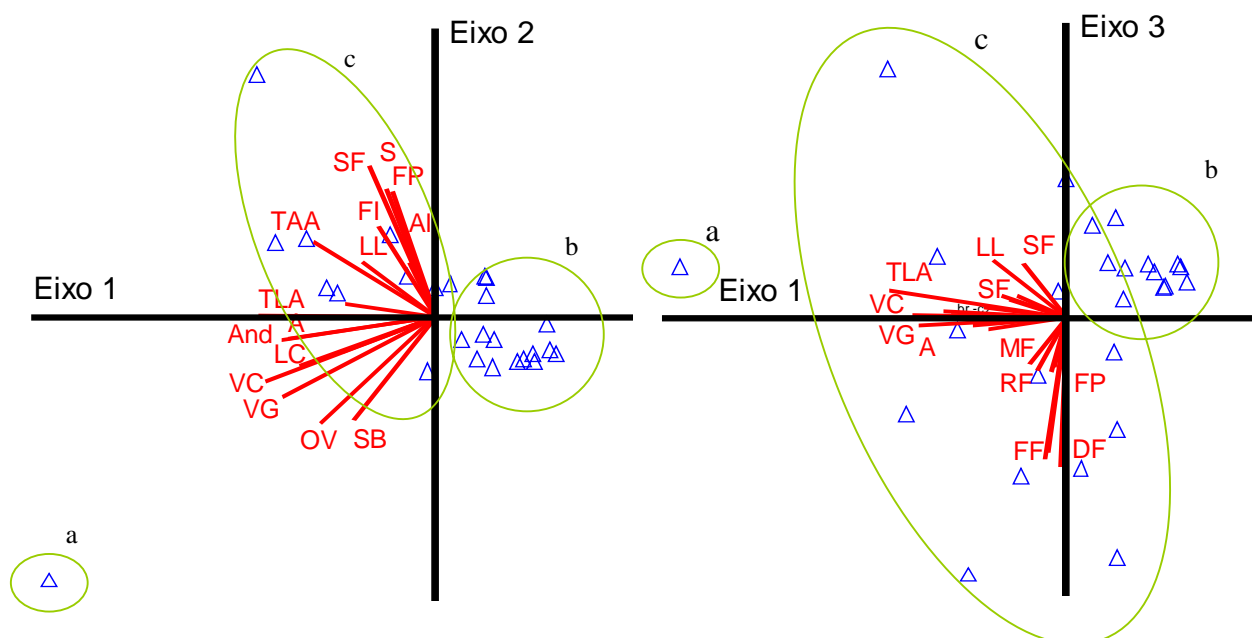


Aplicando a análise dos componentes principais e analisando seus resultados nos gráficos, observa-se a mesma distinção em 3 grupos (fig.3). Novamente aqui, fica claro a posição isolada da dominante; o grupo negativamente relacionado as atividades (não ativo); e o grupo dos indivíduos “operários”, ou seja, positivamente relacionados as atividades intranidais e de forrageamento.

Comparando-se com as idades e os comportamentos de cada indivíduos pode-se dizer que o grupo pouco ativo, é formado por indivíduos recém-emergidos, pouco experientes, e indivíduos mais velhos que acreditamos serem fêmeas com alto potencial para se tornarem dominantes e que funcionam como reserva para futuras substituições da dominante ou fundação de novas colônias. Entre as subordinadas “operárias” (ativas), não se observa a formação de grupos relacionados a funções específicas. Nota-se apenas certa tendência de alguns indivíduos executarem mais um ato comportamental que outros, o que aparece graficamente como um ponto mais distante do vértice (fig 3). Todavia, pode-se afirmar que, para a maioria dos indivíduos, não há especialização, onde um mesmo indivíduo realiza um pouco de cada atividade, não se distanciando da intercessão das retas no gráfico (fig.3).

No ninho ME2 também se observa a formação dos 3 grupos de indivíduos no cladograma, assim como observado no ninho ME1 (fig.4). Entretanto, esta colônia encontrava-se no início da pós-emergência, apresentando reduzido número de indivíduos. Assim, observa-se no gráfico da PCA (fig.5), que a dominante mantém-se isolada, e mesmo o grupo dos indivíduos considerados como não ativos no ME1, aqui executa algum tipo de ato comportamental para o desenvolvimento e manutenção da colônia. Isto é claramente demonstrado pelos gráficos, onde não se observam quadrantes em que não hajam vetores, ou indivíduos em posição oposta a todos os vetores. É interessante notar que o padrão de dispersão dos indivíduos, mostrando a tendência à maior frequência de execução de determinados comportamentos, observado em poucos indivíduos em ME1, mostra-se mais evidente neste ninho, possivelmente pelo reduzido número de indivíduos, neste início de pós-emergência.

**Figura 3** Representação gráfica da análise multivariada dos componentes principais, aplicada para os indivíduos do ninho ME1.

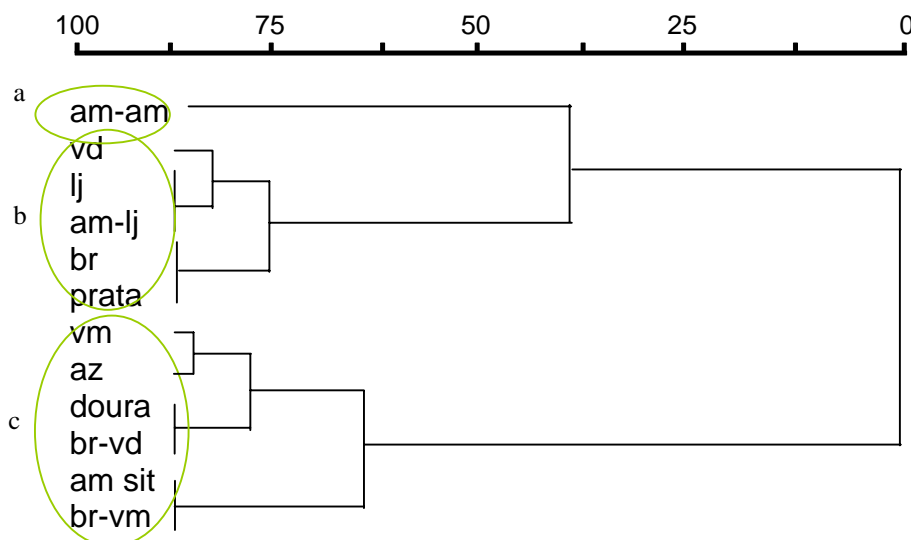


Leg. Os triângulos azuis ( $\Delta$ ) representam os indivíduos da colônia, os vetores vermelhos ( $-$ ) os comportamentos e seu comprimento a intensidade com que o comportamento contribui para dispersão dos indivíduos no gráfico. Para legenda dos comportamentos consulte etograma (pág. 14). Dominante (a); Indivíduos negativamente relacionados aos comportamentos (b); subordinadas “operárias” (c).

Fica claro que o reduzido número de indivíduos faz com que todos sejam recrutados para o trabalho. Desta forma, o cladograma apresentado (fig.4), encontra-se dividido entre dominante, subordinadas forrageiras ou que realizam outras atividades dentro da colônia e subordinadas que realizam poucos comportamentos ou comportamentos diferentes das dominantes.

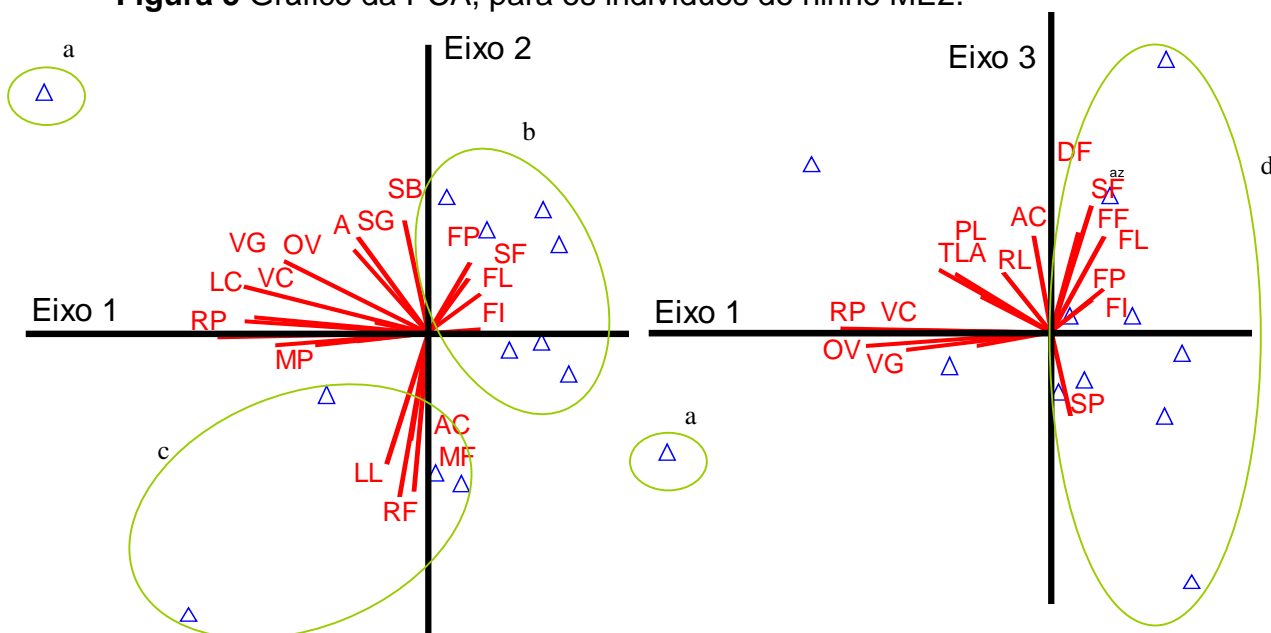
Já no ninho ME4, observam-se 4 grupos divididos no cladograma (fig.6), sendo os 3 comuns para os outros ninhos e um quarto grupo formado por dois indivíduos, um bastante velho e um muito novo, que permaneceram a maior parte do tempo imóveis, constituindo um grupo atípico.

**Figura 4** Dendrograma dos indivíduos da colônia ME2, agrupados de acordo com a frequência de realização dos comportamentos.



Leg. Dominante (a); Subordinadas forrageiras ou que realizam outras atividades dentro da colônia (b); Subordinadas que realizam poucos comportamentos ou comportamentos diferentes das dominantes (c).

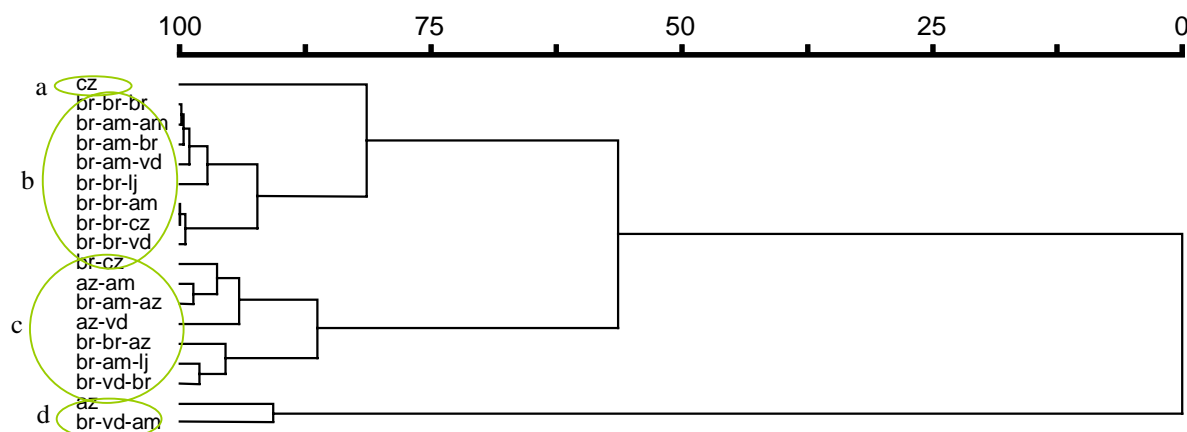
**Figura 5** Gráfico da PCA, para os indivíduos do ninho ME2.



Leg. Os triângulos azuis (Δ) representam os indivíduos da colônia e os vetores vermelhos (-) os comportamentos, sendo seu comprimento a intensidade com que contribui para dispersão dos indivíduos no gráfico. Para legenda dos comportamentos consulte etograma (pág. 14). Dominante (a); Subordinadas forrageiras (b); Subordinadas ligadas a trabalhos intranidais (c); Subordinadas forrageiras dispersas ao longo do eixo 3, de acordo com a frequência que realizavam cada comportamento (d).

Quando analisamos o gráfico da PCA, observa-se uma segregação dos indivíduos, deixando clara a especialização dos mesmos em determinados comportamentos.

**Figura 6** Dendrograma dos indivíduos da colônia ME4, agrupados de acordo com a freqüência de realização dos comportamentos.



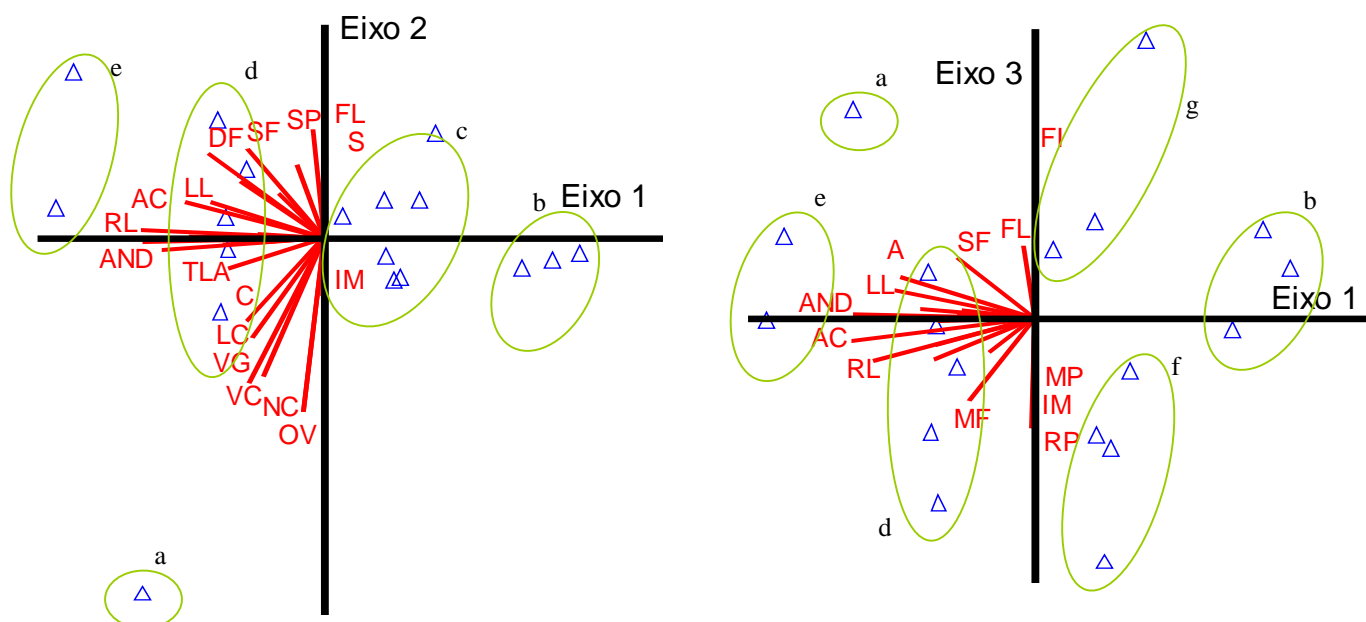
Leg. Dominante (a); Subordinadas forrageiras ou que realizam outras atividades dentro da colônia (b); Subordinadas que realizam poucos comportamentos ou comportamentos diferentes das dominantes (c); Subordinadas que permaneceram a maior parte do tempo imóveis (d).

Graficamente, quando somamos os primeiros 3 eixos da PCA, obtemos uma representação tridimensional das relações entre os indivíduos, que mostra a distinção de diferentes grupos com tendência à realização de determinados comportamentos, observando-se que o grupo dos indivíduos pouco ativos, pode ser dividido entre indivíduos que não trabalham, os que realizam pouco forrageamento (infrutífero ou néctar) e os que trabalham pouco mas solicitam bastante alimento de outros adultos. Já entre as subordinadas “operárias”, há aquelas que realizam quaisquer comportamentos, e outras mais especializadas em construção do ninho, neste caso (fig.7).

Assim, a análise geral das colônias em pós-emergência, demonstra que há 3 grupos claramente distintos, a dominante, as subordinadas ativas e as não ativas, que aparecem nitidamente, quanto maior for o intervalo de tempo observado. Estes mesmos 3 grupos já foram observados em *Mischocyttarus*

*cerberus styx*, apresentando basicamente as mesmas funções (NODA *et al.*, 2001). Entretanto, quando várias horas de observação são realizada em um curto intervalo de tempo, pode-se observar certa tendência a especialização entre os indivíduos da colônia. Para Blanchard *et al.* (2000) a especialização é caracterizada como a realização de uma seqüência restrita de tarefas, por um determinado tempo. Como não há limitações para este tempo, podemos afirmar que ocorre especialização momentânea em *P. versicolor*.

**Figura 7** Representação gráfica da análise multivariada aplicada para os indivíduos do ninho ME4.



Leg. Os triângulos azuis ( $\Delta$ ) representam os indivíduos da colônia e os vetores vermelhos ( $\rightarrow$ ) os comportamentos, sendo seu comprimento a intensidade com que contribui para dispersão dos indivíduos no gráfico. Para legenda dos comportamentos consulte etograma. Dominante (a); Subordinadas inativas (b); Subordinadas que realizam poucos trabalhos (c); Subordinadas que realizam qualquer trabalho (d); Subordinadas mais especializadas em construção (e). O grupo c pode ser subdividido em dois outros grupo, no eixo 3, diferindo principalmente pelos indivíduos que realizam poucas saídas de forrageamento (g) e aqueles que solicitam bastante alimento (f).

Para Hölldobler e Wilson (1990) a especialização na divisão do trabalho é a chave para o sucesso evolutivo de todos os insetos sociais. Esta especialidade para realização de determinadas tarefas, por curto intervalo de tempo, é, provavelmente, regulada pela necessidade da colônia ou localização e esgotamento de uma fonte de recurso. Corroborando com tal idéia, pode-se

citar a observação feita com *Polistes lanio lanio*, onde um indivíduo que forrageava água em uma determinada fonte, retornou várias vezes, ao longo do dia para coletá-la, até que eliminou-se tal fonte d'água. Quando aquele indivíduo retornou e não encontrou a água, retomou a atividade de forrageamento na vegetação próxima. Provavelmente, o mesmo deve ocorrer com a coleta de outros recursos, sendo esta tendência à especialização momentânea uma alternativa para melhor aproveitamento do recurso, uma vez que este grupo não apresenta recrutamento para exploração em massa, como afirmam Downing (1991) e Jeanne (1996). Como outro exemplo de especialização momentânea, podemos citar os indivíduos que aplicaram secreção no pedúnculo. Suas idades variavam de 1 a 33 dias, evidenciando a não relação etária. Porém, a frequência deste comportamento aumentava após a chuva, indicando ser um comportamento regulado pela necessidade da colônia. E por fim, a atividade de construção no ME4, que também foi realizado por indivíduos diferentes, com idades variáveis. Em determinados dias, apenas 1 ou 2 indivíduos estavam envolvidos em atividades de construção, porém houve dias em que até 11, dos 18 indivíduos da colônia, estavam construindo ou coletando polpa vegetal. A intensificação desta atividade foi sempre observada após ou durante chuva fraca, o que poderia propiciar maior facilidade para coleta da fibra vegetal.

O grupo dos indivíduos não ativos, presente apenas nos ninhos com população mais numerosa, é importante para reposição de indivíduos e deslocamento da massa para sanar necessidades imediatas. Este grupo funcionaria como “uma solução tampão”, mantendo o equilíbrio entre as atividades desempenhadas entre os indivíduos para o desenvolvimento da colônia. Experimentos de remoção de castas demonstraram que em pouco tempo alguns indivíduos passam a ocupar os papéis vagos. Theraulaz *et al.* (1991) mostrou que retirando as forrageiras de um ninho, as vespas que assumiram a posição de forrageiras foram as que exerciam atividades próximas ou relacionadas as larvas, provavelmente por perceberem a fome das mesmas.

Ainda entre os indivíduos pouco ativos, há aqueles de auto grau hierárquico, que não se subordinam e acabam não realizando tarefas na colônia. Entretanto, se comparado com outras espécies de vespas e formigas, estes indivíduos poderiam se enquadrar como intermediários, apresentando funções de postura de ovos não fertilizados, para produção de machos ou ovos tróficos (HEIZER *et al.*, 1999; NOLL e ZUCCHI, 2002; SHIMA *et al.* 2003). Quando estes indivíduos encontram-se inseminados, servem como reserva para substituição da dominante, em casos de morte ou declínio da produtividade, ou para disseminação da espécie, como futuras fundadoras. Da mesma forma, Noda *et al.* (2001) atribui as mesmas funções para os indivíduos chamados de neutros, em colônias de *M. c. styx*.

Muitos autores acreditam que os indivíduos podem mudar rapidamente de comportamentos dentro de uma determinada função, em resposta a demandas locais, porém a mudança de função seria acompanhada de mudanças fisiológicas, ocorrendo, portanto, mais lentamente (THERAULAZ *et al.* 1998; BLANCHARD *et al.* 2000). Quando comparou-se a idade de cada indivíduo com os grupos de comportamentos realizados, pode-se verificar que não há polietismo etário, concordando com o observado por Gobbi (1977), Theraulaz *et al.* (1990) e Zara e Balestieri (2000). Isto poderia levar a pensar que, aparentemente, todos os indivíduos são capazes de realizar qualquer tarefa dentro do ninho, como afirma Gobbi (1977), não havendo limitação morfo-fisiológicas para tal, e sim, apenas ajustes às condições momentâneas. Entretanto, para afirmar-mos isto seria necessário conhecermos mais sobre as relações morfo-fisiológicas com os comportamentos, as influências externas que promovem as mudanças de funções entre os indivíduos e como os comportamentos mudam em resposta as necessidades da colônia, mas tais conceitos ainda permanecem amplamente desconhecidos (BLANCHARD *et al.* 2000). Para estes últimos autores, uma hipótese para alteração dos comportamentos e divisão de trabalho na colônia é a variação nutricional. Eles acreditam que a quantidade de lipídio estocado pelo indivíduo influencia a predisposição para determinados comportamentos e uma mudança neste

*status* nutricional mudaria seu papel na colônia, muitas vezes até pela influência que isto traz à regulação hormonal do indivíduo.

De qualquer forma, apesar de termos identificado 3 grupos de indivíduos, as subordinadas ativas são responsáveis por praticamente toda atividade de manutenção e construção da colônia, cabendo a elas a maior parte dos comportamentos realizados, sendo a alteração de um para outro, um evento aparentemente rápido. Assim, acreditamos que, possivelmente pelo fato de ainda realizarem fundações por haplometrose, o que obriga a fundadora a executar todas as tarefas para crescimento e manutenção da colônia, durante a pré-emergência, haja a habilidade de alternar entre os comportamentos, sem a necessidade de grandes alterações fisiológicas e que este seja um caminho de duas vias, podendo ser feito e desfeito, conforme a necessidade.

### **Polietismo em colônias em final de ciclo**

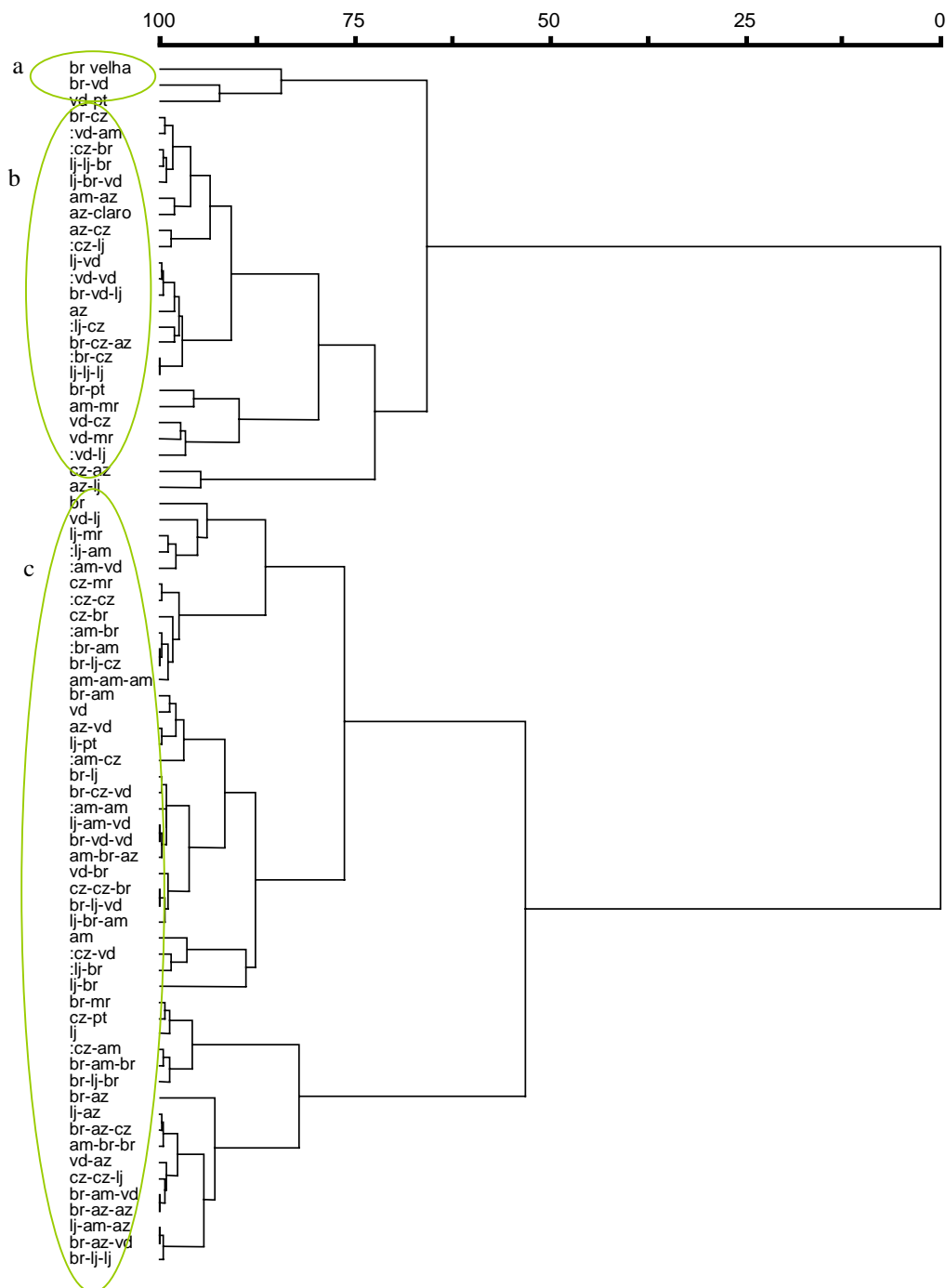
As colônias ME3 e ME5, foram observadas quando encontravam-se em final de ciclo. Esta fase, também chamada de declínio, é caracterizada pelo grande número de células vazias e subsequente diminuição dos indivíduos em estágios imaturos (GOBBI, 1977; REEVE, 1991).

A colônia ME3 era grande, com muitos indivíduos ainda no ninho, tendo sido observada por um longo período. Já a colônia ME5 apresentava um número relativamente pequeno de indivíduos e foi observada continuamente em um curto intervalo de tempo.

No ninho ME3 distinguem-se 3 grupos de indivíduos no cladograma, como nas colônias em pós-emergência, porém não mais se observa apenas um indivíduo no grupo da dominante e mesmo os demais grupos encontram-se com grandes divisões, indicando uma certa desestruturação dos grupos funcionais, novamente, se comparado às colônias em pós-emergência.



**Figura 8** Dendrograma dos indivíduos da colônia ME3, agrupados de acordo com a frequência de realização dos comportamentos.

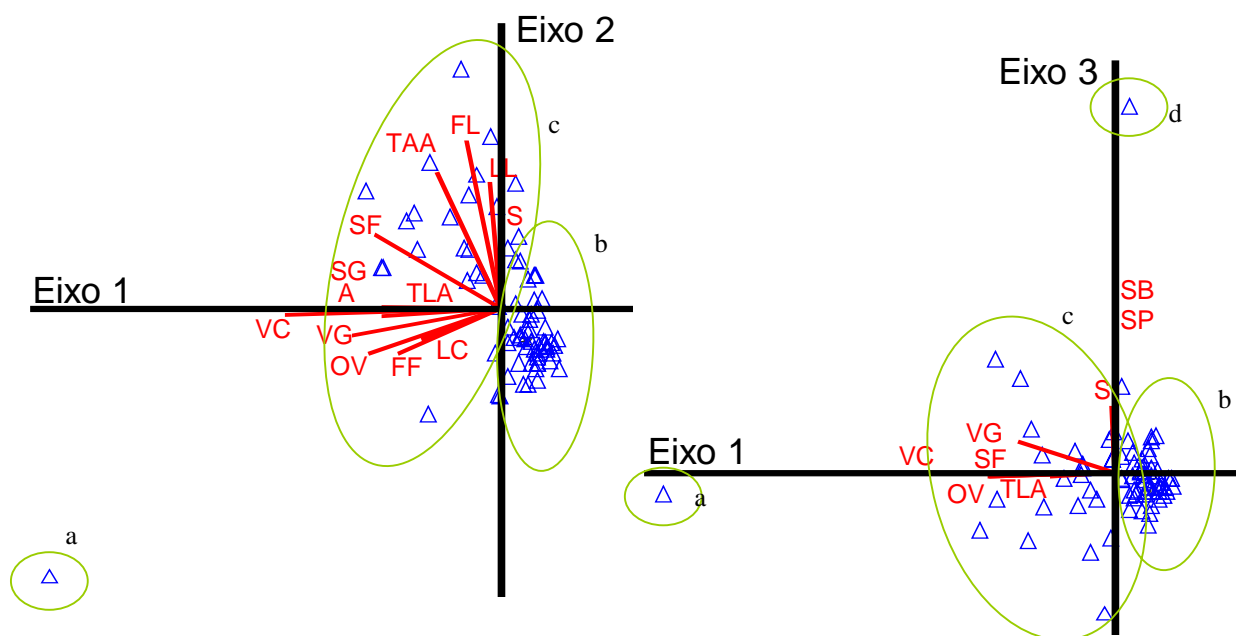


Leg. Grupo ligado a dominância (a); Subordinadas que realizam atividades que as aproximam da dominante (b); Subordinadas que realizam poucos comportamentos ou comportamentos diferentes das dominantes (c).

Quando se analisa o terceiro eixo observa-se a tendência de alguns indivíduos começarem a apresentar os mesmos comportamentos que a dominante, porém em menor frequência, o que não era observado na pós-emergência. Estes indivíduos podem ser considerados dominantes em potencial. Todavia, é importante ressaltar que apesar disso tudo, a dominante principal da colônia ainda se mantém isolada, mostrando que não há poliginia, como poderia se supor, visto o grande número de dominantes em potencial.

Assim, pode-se inferir que o aumento do número de possíveis dominantes desestruturaria a organização funcional da colônia, pela redução do grupo de subordinadas ativas, resultando na estagnação do desenvolvimento e, possivelmente déficit nutricional, forçando os indivíduos a abandonarem a colônia mãe e fundar suas próprias colônias. Noda *et al.* (2001) também coloca o crescimento do grupo de indivíduos neutros como uma possível causa para o declínio da colônia de *M. c. styx*.

**Figura 9** Representação gráfica da PCA aplicada aos indivíduos do ninho ME3.



Leg. Os triângulos azuis ( $\Delta$ ) representam os indivíduos da colônia e os vetores vermelhos ( $-$ ) os comportamentos, sendo seu comprimento a intensidade com que contribui para dispersão dos indivíduos no gráfico. Para legenda dos comportamentos consulte etograma (pág. 14). Dominante (a); Subordinadas que não trabalham (b); Subordinadas que realizam poucos trabalhos (c); Subordinadas mais especializadas (d).

Não se observa a tendência à especialização dos indivíduos, quanto aos comportamentos executados, mas, como visto anteriormente, o longo tempo de observação poderia estar influenciando este dado.

Graficamente, os dados da PCA indicam que a grande maioria dos indivíduos da colônia são pouco ativos. Estão também negativamente relacionados à subordinação e forrageamento, mostrando a redução do controle da dominante sobre os mesmos. Há ainda indivíduos subordinados operários, entretanto são poucos e encontram-se mais relacionados ao forrageamento de líquido para alimentação dos adultos.

Já o ME5 apresenta, no cladograma, novamente 3 grupos, com a dominante inserida em um grupo e não mais isolada. Os grupos formados apresentam-se, basicamente, da mesma forma que observado em ME3, desestruturados, com grandes divisões entre os 2 grupos de subordinadas.

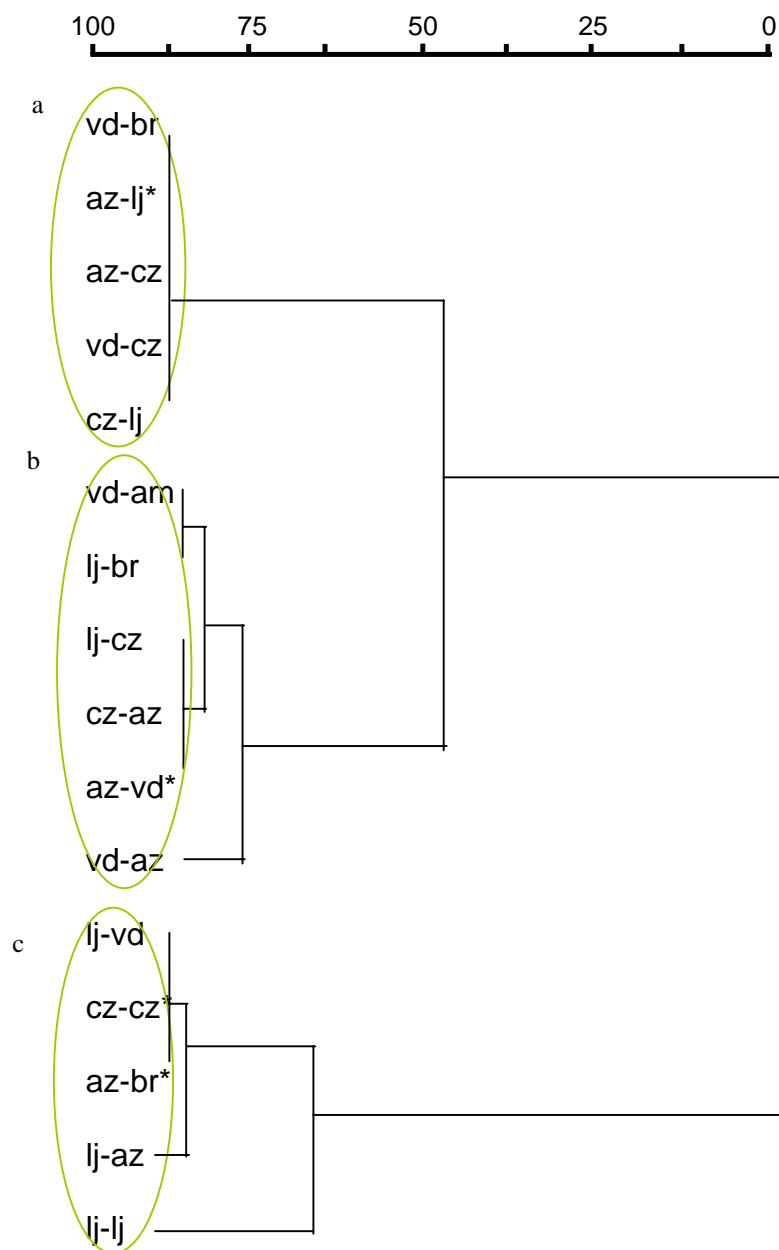
Graficamente, pela PCA, observa-se 4 grupos sendo eles: a dominante isolada, um grupo de indivíduos não ativos, outro de pouco ativos e o último, formado por subordinadas forrageiras.

Neste ninho não haviam indivíduos forrageando presas e a dominante realizava mais saídas que o normal. Havia alta frequência de canibalismo das larvas, por parte da dominante, e apenas dois indivíduos eram mesmo subordinadas forrageiras, que traziam alimento líquido para colônia. Estas subordinadas forrageiras eram os indivíduos mais velhos da colônia.

Os machos presentes, observados apenas neste ninho, encontravam-se entre os indivíduos pouco ativos e que constantemente solicitavam alimento, das subordinadas e larvas.

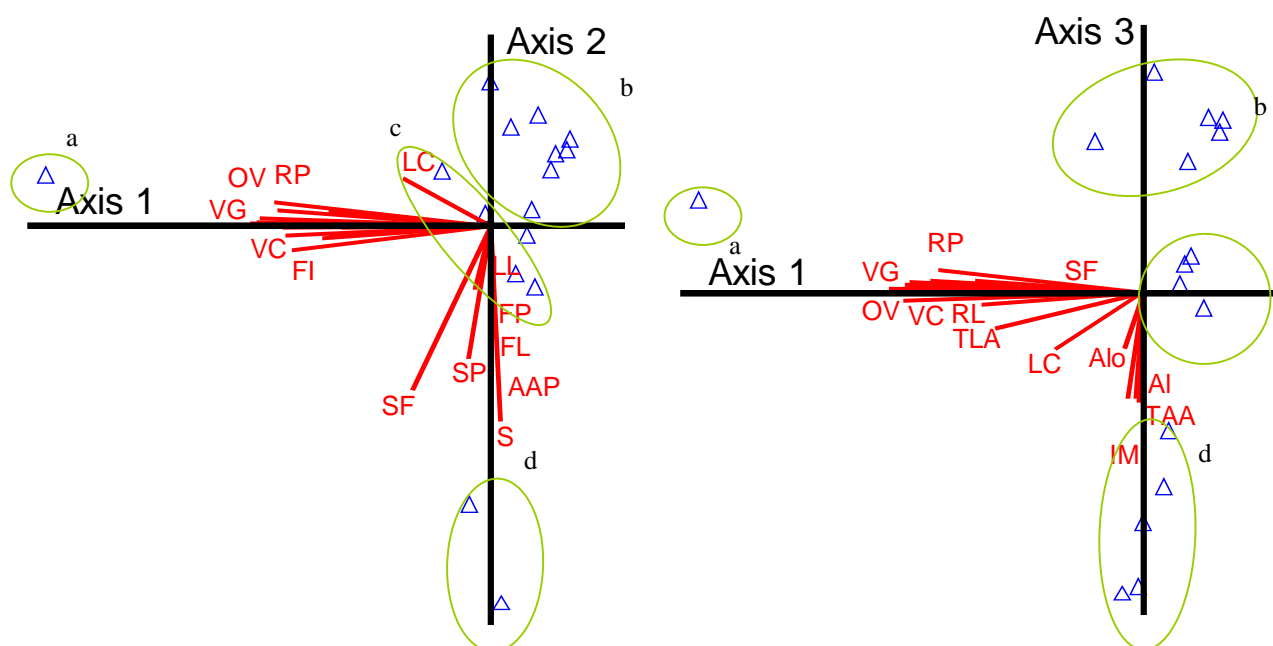
Não há tendência à especialização comportamental entre os indivíduos das colônias em final de ciclo, como observado nas colônias em pós-emergência, mesmo com o curto intervalo de tempo de observação da colônia ME5. Ao contrário, estes indivíduos parecem realizar o mínimo possível de comportamentos. Noda *et al.* (2001), observando *M. c. styx*, também relata que durante o declínio ou final de ciclo, há muitas fêmeas chamadas, por estes autores, de neutras (50% da colônia), por não forragearem, não receberem alimento e não interagirem com outras vespas.

**Figura 10** Dendrograma dos indivíduos da colônia ME5, agrupados de acordo com a frequência de realização dos comportamentos.



Leg. Grupo relacionado a dominância (a); Subordinadas comportamentalmente próximas a dominante (b); Subordinadas que realizam poucos comportamentos ou comportamentos diferentes das dominantes (c); Machos (\*).

**Figura 12** Representação gráfica da análise multivariada aplicada para os indivíduos do ninho ME5.



Leg. Os triângulos azuis ( $\Delta$ ) representam os indivíduos da colônia e os vetores vermelhos ( $-$ ) os comportamentos, sendo seu comprimento a intensidade com que contribui para dispersão dos indivíduos no gráfico. Para legenda dos comportamentos consulte etograma. Dominante (a); Subordinadas não ativas (b); Subordinadas que realizam poucas atividades, principalmente trofalaxia com adulto, alarme e *allogrooming* (c); Subordinadas forrageiras (d).

De acordo com Strassmann *et al.* (1984) em estágios avançados do desenvolvimento da colônia, fêmeas de *P. exclamans*, apenas começam a forragear quando é essencial para o sucesso da colônia e não há outras forrageiras presentes, uma vez que geralmente optam por substituir a dominante em momento oportuno ou fundar um ninho satélite. Em *P. versicolor* não podemos afirmar que se fossem retiradas as forrageiras, outros indivíduos assumiriam esta posição, nas colônias em final de ciclo, por não terem sido realizados experimentos deste tipo, mas, da mesma forma que Noda *et al.* (2003), acreditamos que os indivíduos pouco ativos sejam os jovens com alto potencial para fundarem novas colônias, o que poderia resultar na antecipação do processo de abandono, caso fosse feita a retirada das forrageiras.

Os únicos indivíduos que ainda se mantinham ativos foram as subordinadas forrageiras mais velhas, que seguiam com as atividades de forrageamento, enquanto os demais indivíduos praticamente não realizavam atividades na colônia. Entretanto, elas não são especialistas, mas sim indivíduos que continuam realizando as atividades de forrageamento, enquanto as demais encontram-se não ativas. Provavelmente, a aceitação da posição de subordinada forrageira, neste caso, se deva à impossibilidade de tornarem-se dominantes, visto que, segundo Carneiro Silva (1991), assim que uma fêmea atinge determinada idade, sem que tenha botado, pela inibição da dominante, o ovário começa a se degenerar.

Assim, pode-se concluir que, no final de ciclo, as colônias se desestabilizam quanto a divisão de funções para sua manutenção e desenvolvimento. A dominante continua mantendo sua posição isolada, caracterizando uma colônia monogínica até o final do desenvolvimento, apesar de haver algumas subordinadas que se aproximam dela quanto aos comportamentos realizados.

As demais subordinadas, mesmo que não se aproximem da dominante, reduzem seu repertório de atividades, apresentando apenas alguns poucos comportamentos para manutenção dos adultos da colônia. Não há investimento na produção ou manutenção das crias. Apenas os indivíduos mais velhos, entre as subordinadas, ainda se mantêm ativos, quanto a manutenção da colônia, provavelmente por apresentarem limitações físicas para deixar a posição.

### **Diferenças entre observações contínuas e descontínuas**

Quando se comparam as freqüências comportamentais observadas entre os ninhos ME4 (contínua) e ME1 e ME2 (descontínuas), em pós-emergência (tab. 3) e os ninhos ME3 (descontínua) e ME5 (contínua), em final de ciclo (tab. 5), pode-se notar que praticamente não há diferenças entre as freqüências comportamentais observadas, entre dominantes e subordinadas,

salvo aquelas referentes a variáveis externas, por exemplo climáticas, como já discutido nos itens anteriores.

Entretanto, a observação contínua possibilitou a constatação de comportamentos raros, realizados em baixas frequências como a larvifagia, retirar larva sem larvifagia, verificar célula esfregando o gaster, limpar e por água na célula, nas colônias em pós-emergência e tamborilar com as antenas, verificar célula esfregando o gaster e aplicar secreção oral sobre as pupas, nas colônias em final de ciclo. Todavia, acreditamos que a maior parte dos comportamentos raros são realizados em ocasiões particulares, como forma de adaptação ou adequação às circunstâncias particulares.

Outra diferença observada foi quanto a especialização momentânea, evidenciado pela análise dos componentes principais, onde pelo método descontínuo não pode ser notado, visto que tal especialização ocorre por um intervalo de tempo relativamente curto. Isto só foi notado quando realizamos o método contínuo de observação, somando várias horas em um curto espaço de tempo, tendo assim, real noção da situação de cada indivíduo naquele momento da vida.

## Bibliografia

- ALTMANN, J. Observational study of behaviour: Sampling methods. **Behaviour**, Leiden, v. 49, p. 227-267, 1974.
- BLANCHARD, G. B.; ORLEDGES, G. M.; REYNOLDS, S. E.; FRANKS, N. R. Division of labour and seasonality in the ant *Leptothorax albipennis*: worker corpulence and its influence on behaviour. **Animal Behaviour**, London, v. 59, p. 723-738, 2000.
- CARNEIRO SILVA, A. **Determinação do sistema de substituição de fêmeas dominantes em colônias de *Polistes* (Vespidae - Polistinae)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1991.
- CUMBER, R. A. Some observations on the biology of the Australian wasp *Polistes humilis* Fabr. (Hymenoptera: Vespidae) in North Auckland (New Zealand), with special reference to the nature of the worker cast. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, London, v. 26, p. 11-16, 1951.
- DOWNING, H. A. The function and Evolution of Exocrine Glands. In: ROSS, K. G.; MATTHEWS, R. W. (Org.). **The Social Biology of Wasps**. New York: Cornell University Press, 1991. p. 540-569.
- DOWNING, H. A.; JEANNE, R. L. Correlation of season and dominance status with activity of exocrine glands in *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). **Zeitschrift für Tierpsychologie**, Berlin, v. 67, p. 78-96, 1983.
- EDWARDS, R. **Social Wasps - Their Biology and Control**. East Grinstead: Rentokil Limited, 1980.
- ESPELIE, K. E., HERMANN, H. R. Surface lipids of the social wasps *Polistes annularis* and its nest and nest pedicel. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 1841-1852, 1990.
- EVANS, H. E; WEST-EBERHARD, M. J. **The Wasps**. An Arbor: University of Michigan Press. 1970.
- FRESNEAU, D.; DUPUY, P. A study of polyethism in a ponerine ant: *Neoponera apicalis* (Hymenoptera, Formicidae). **Animal Behaviour**, London, v. 36, p. 1389 -1399, 1988.
- GADAGKAR, R.; JOSHI, N. V. Social organization in the indian wasp *Ropalidia cyathiformis* (Fab.) (Hymenoptera, Vespidae). **Zeitschrift für Tierpsychologie**, Berlin, v. 64, p. 15-32, 1984.
- GIANNOTTI, E. **Estudos biológicos e etológicos da vespa social neotropical *Polistes (Aphanilopterus) lanio lanio***. Tese (Doutorado em Zoologia). UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1992.



- GIANNOTTI, E. Social organization of the eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, Chico, v. 33, n. 3, p. 325-337, 1999.
- GIANNOTTI, E., MACHADO, V. L. L. Behavioral castes in the primitively eussocial wasp *Polistes lanio lanio*. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 43, p. 185-90, 1999.
- GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor***. Tese (Doutorado em Genética). USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1977.
- HEINZE, J.; FOITZIK, S.; OBERSTADT, B.; RUPPELL, O.; HÖLLDOBLER, B. A female caste specialized for the production of unfertilized eggs in the ant *Crematogaster smithi*. **Naturwissenschaften**, Halle, v. 86, p. 93-95, 1999.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Berlin: Springer-Verlag. 1990.
- HUNT, J. H. 1991. Nourishment and the evolution of the social Vespidae. In: ROSS, K. G.; MATTHEWS, R. W. (Org.) **The Social Biology of Wasps**. New York: Cornell University Press. 1991.
- JEANNE, R. L. Social biology of the neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, Cambridge, v. 114, p. 63-150, 1972.
- JEANNE, R. L. The Evolution of Exocrine Gland Function in Wasps. In: TURILLAZZI, S.; WEST-EBERHARD, M. J. **Natural History and Evolution of Paper Wasps**. Oxford: Oxford University Press. p. 144-160, 1996.
- KEEPING, M. G. 2000. Morpho-physiological variability and differentiation of reproductive roles among foundresses of the primitively eusocial wasp, *Belonogaster petiolata* (Degeer) (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v.47. p.147-154, 2000.
- LANDOLT, P. J.; AKRE, R. D. Occurrence and Location of Exocrine Glands in Some Social Vespidae (Hymenoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 72, n. 1, p. 141-148, 1979.
- MARKIEWICZ, D. A., O'DONNELL, S. Social dominance, task performance and nutrition: implications for reproduction in eusocial wasps. **Journal of Comparative Physiology A. Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, New York, v. 187, p. 327-333, 2001.
- MATSUURA, M. Comparative biology of the five Japanese species of the genus *Vespa* (Hymenoptera, Vespidae). **The Bulletin of the Faculty of Agriculture**, Mie University, n. 69, p. 1-131, 1984.
- MAULE-RODRIGUES, V. **Estudo sobre vespas sociais do Brasil (Hymenoptera, Vespidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Rio Claro, 1968.

- NODA, S. C. M.; SILVA, E. R.; GIANNOTTI, E. Dominance Hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3B, p. 603-614, 2001.
- NODA, S. C. M.; SHIMA, S. N.; NOLL, F. B. Morphological and physiological caste differences in *Synoeca cyanea* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini) According to the ontogenetic development of the colonies. **Sociobiology**, Chico, v. 41, n. 3, p. 547-570, 2003.
- NOLL, F. B.; ZUCCHI, R. Castes and influence of the colony cycle in swarm-founding polistine wasps (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 49, p. 62-74, 2002.
- PARDI, L. Ricerche sui Polistini. XI Sulla durata della permanenza delle femmine nel nido e Sull'accrescimento della societa in *Polistes gallicus*. L. **Atti. Soc. Tosc. Sci. Nat.**, Pisa, v. 55, p. 3-15, 1948.
- PRATTE, M.; JEANNE, R. L. Antennal drumming behaviour in *Polistes* wasps (Hymenoptera: Vespidae). **Zeitschrift für Tierpsychologie**, Berlin, v. 66, p. 177-188, 1984.
- REEVE, H. K. *Polistes*. In: ROSS, K. G.; MATTHEWS, R. W. (Org.) **The Social Biology of Wasps**. New York: Cornell University Press, p. 99-148, 1991.
- RICHARDS, O. W. **The species of America, Excluding the Vespinae**. London: British Museum, 1978.
- SHIMA, S. N.; NOLL, F. B.; ZUCCHI, R. Influence of the colony cycle on physiological and morphological caste variation in the perinéal neotropical swarm-founding social wasp, *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). **Sociobiology**, Chico, v. 42. n. 2 p. 449-466, 2003.
- SINZATO, D. M. S.; PREZOTO, F. Aspectos comportamentais de fêmeas dominantes e subordinadas de *Polistes versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae) em colônias na fase de fundação. **Revista de Etologia**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 121-127, 2000.
- SINZATO, D. M. S.; PREZOTO, F.; DEL-CLARO, K. The role of males in a neotropical paper wasp, *Polistes ferreri* Saussure, 1853 (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). **Revista Brasileira de Zociências**, Juiz de Fora, v. 5, n. 1, p. 89-100, 2003.
- STRASSMANN, J. E.; MEYER, D. C.; MATLOCK, R. L. Behavioral castes in social wasp *Polistes exclamans* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, Chico, v. 8, n. 3. p. 210-224, 1984.
- THERAULAZ, G.; PRATTE, M.; GERVET, J. Behavioral profiles in *Polistes dominulus* (Christ) wasp societies: a quantitative study. **Behaviour**, Leiden, v. 113, n. 3-4, p.223-250, 1990.

- THERAULAZ, G.; GERVET, J.; TIAN-CHANSKI, S. S. Social regulation of foraging activities in *Polistes dominulus* Christ: a systematic approach to behavioral organization. **Behaviour**, Leiden, v. 116, p. 292-320, 1991.
- TURILLAZZI, S., UGOLONI, A. Rubbing behaviour in some european *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). **Monitore Zoologico Italiano**, Firenze, v. 13, p. 129-42, 1979.
- WEST-EBERHARD, M. J. The social biology of the Polistinae wasps. **Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology**, Ann Arbor, v. 140, p. 1-101, 1969.
- YOSHIKAWA, K. Introductory studies in the life economy of Polistine wasps. II Superindividual stage. 2. Division of labor among workers. **Japanese Journal of Ecology**, Tokyo, v. 13, p. 53-56, 1963.
- ZARA, J. F.; BALESTIERI, J. B. P. Behavioural catalogue of *Polistes versicolor*. Post emergent colonies (Vespidae: Polistinae). **Naturalia**, São Paulo, v. 25, p. 301-319, 2000.

## **CAPÍTULO 2**

### **Comportamento de machos de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae).**

#### **Resumo**

Machos de vespas constituem material de grande interesse biológico por apresentarem aspectos de sua vida, anatomia e fisiologia ainda pouco conhecidos. Por meio da marcação dos indivíduos e observação direta, determinou-se padrões de comportamento para os machos de *Polistes versicolor*. Estes são capazes de realizar 21 atos comportamentais, não havendo relação clara entre a realização destes com a idade. Observou-se a produção simultânea de machos e fêmeas em uma mesma colônia, ocorrendo cópulas no ninho, entre possíveis irmãos.

#### **Abstract**

Wasps males constitute an interesting biological material for presenting unknown aspects of life, anatomy, and physiology. Through the individuals' demarcation and direct observation have been determined the comportamental patterns of *Polistes versicolor* males. They are capable of accomplishing 21 comportamental acts, without clear relationship with age. It was observed the simultaneous production of males and females in a same colony, being observed copulation in the nest between possible siblings.

## Introdução

Poucos são os estudos sobre comportamento de machos de vespídeos sociais encontrados na literatura. Destes, a maioria apresenta apenas dados referentes à produção de machos e comportamento de cópula (CASTELLÓN, 1982; POST e JEANNE, 1983b; MIYANO, 1986; BEANI e TURILLAZZI, 1988; REED e LANDOLT, 1990). Entretanto, dos trabalhos que abordam aspectos biológicos e comportamentais dos machos de vespas sociais do gênero *Polistes*, atividades como a manutenção do ninho e cuidado com a cria, repetem-se entre as espécies analisadas (HUNT e NOONAN, 1979; MAKINO, 1983; CAMERON, 1986; SINZATO *et al.*, 2003) indicando que os mesmos podem apresentar funções significativas dentro da colônia, apesar da maioria dos comportamentos estarem mesmo envolvidos com suas funções vitais ou fisiológicas.

O presente trabalho apresenta um etograma, com análise da função dos machos na colônia de *Polistes versicolor* e de seu comportamento reprodutivo.

## Material e Métodos

Duas colônias em período de pós-emergência, onde se observou a presença de machos, foram coletadas em 28 de novembro de 2003, no distrito de Ajapi, município de Rio Claro, e translocadas para a área externa do prédio do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia, da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro (22°24'36" S; 47°33'36" W; 600m acima do nível do mar), onde se realizaram as observações.

Os indivíduos foram marcados com tinta para aeromodelismo atóxica (Testors), sobre o tórax (mesoscuto), numa combinação de até três cores para cada indivíduo, como já realizado por outros autores, como Zara e Balestiere (2000). As marcações eram diárias, logo pela manhã, ou assim que se observava a emergência de novos indivíduos.

Guiados por esta marcação acompanhamos a idade e os comportamentos de cada indivíduo, pelo método *Scanning* (ALTMANN, 1974).

Oito machos foram observados em um dos ninhos (ME5), onde foram realizadas observações diárias, sendo 3 horas no período da manhã e 4 à tarde, entre os dias 06 e 13 de janeiro de 2004 (observações contínuas). Apenas em dias de chuva forte não se realizou observação, até mesmo pela inatividade dos indivíduos. Ao todo, foram realizadas 36 horas de observações.

Com base nos dados obtidos montou-se um etograma comportamental, uma tabela de freqüências comportamentais, além de um gráfico de freqüência comportamental pela idade em dias dos indivíduos, para discussão do papel dos machos nas colônias de *P. versicolor*.

## Resultados e Discussão

Os machos de *Polistes versicolor* são parecidos com as fêmeas, mas a face, as coxas e o mesoesterno são mais amarelados. Segundo Richards (1978) os machos de *Polistes*, do subgênero *Aphanilopterus*, onde se encontra a espécie *P. versicolor*, podem mesmo ser distinguidos pela face e o mesoesterno amarelados, além do quarto segmento da antena ser duas vezes maior do que a sua parte mais larga; o décimo terceiro segmento da antena perto de quatro vezes mais comprido que sua parte mais larga e, por fim, olhos um pouco mais dilatados inferiormente. Entretanto, na citação acima, fica confusa a distinção dos segmentos antenais usados pelo autor na diferenciação sexual, assim, após comparação, pudemos verificar que o 3<sup>o</sup> segmento, ou seja, o primeiro segmento do flagelo, apresenta comprimento quatro vezes maior que sua largura e que o 13<sup>o</sup> segmento da antena, que apenas os machos apresentam, é duas vezes mais comprido que sua largura, não se apresentando em forma de gancho, como observado nos Eumenidae por Spradbery (1973).

O tempo de permanência dos machos de *P. versicolor* no ninho variou de 1 a 5 dias. Para *P. ferreri* observou-se uma média de permanência de 8.06 dias (SINZATO *et al.*, 2003), enquanto *P. lanio lanio* a média foi de  $10.52 \pm 4.76$  dias (GIANNOTTI, 1992), e para *P. gallicus* de 40 a 50 dias (GERVET *et al.*, 1985).

Para Richards (1978) a permanência dos machos no ninho é maior naquelas espécies em que os machos se parecem com as fêmeas na coloração, como no caso de *P. canadensis*, em que os machos ficam no ninho por um tempo considerável após a emergência (WEST-EBERHARD, 1969). Já em *P. fuscatus*, os machos são rapidamente expulsos do ninho, sendo que se apresentam diferenciados das fêmeas, especialmente na coloração da face e mesosterno (RICHARDS, 1978). Entretanto, tal suposição fica comprometida para *P. versicolor* onde, apesar de diferente na coloração, raramente se observou a agressão aos machos por parte das fêmeas, mesmo durante um episódio de substituição de dominante, em que a desafiante, assim que expulsou a antiga dominante, agrediu todas as fêmeas que se encontravam no ninho, porém sem perturbar os machos, que ficaram imóveis na face frontal do ninho. Em *Mischocyttarus mastigophorus*, O'Donnell (1999), também não observou fêmeas agredindo os machos, mas relatou agressão por parte dos machos sobre as fêmeas. Tais observações sugerem o reconhecimento, provavelmente por meio químico, dos machos, e não puramente visual. Experimentos comportamentais em *Polistes* indicam que odores, provavelmente feromônios, estejam envolvidos em processos de reconhecimento dos companheiros de ninho (GAMBOA *et al.*, 1986; GAMBOA, 1996). Estudando estes mecanismos de reconhecimento, Shellman e Gamboa (1982), Pfennig *et al.* (1983a, b) e Gamboa *et al.* (1986, 1987) sugeriram que este fenômeno se dá pela identificação de odores adquiridos, parte na fase larval e parte na fase adulta. Os autores sugeriram também que esses odores apresentam componentes herdáveis e ambientais, que agem em sinergia para produzir um efeito de tolerância entre essas vespas. Em *P. biglumis bimaculatus*, Lorenzi *et al.* (1997) mostraram uma mistura de hidrocarbonetos epicuticulares utilizados no reconhecimento das companheiras de ninho. Segundo Dani *et al.* (1996) a secreção da glândula de Dufour, em *P. dominulus*, contém uma mistura de hidrocarbonetos que coincidem com aqueles observados na cutícula, mas diferem na proporção de seus constituintes. Assim estes autores sugerem que a glândula de Dufour pode estar envolvida na síntese destes hidrocarbonetos cuticulares. Entretanto, estudos realizados com a formiga

*Cataglyphis niger* demonstraram que os hidrocarbonetos são sintetizados no corpo gorduroso e secretados na hemolinfa, sendo transportado para a glândula pós-faríngea e cutícula (SOROKER e HEFETZ, 2000). Desta forma pode-se supor que provavelmente a glândula de Dufour também esteja seqüestrando estes hidrocarbonetos e não os produzindo, pois no caso dos machos, que não apresentam a glândula de Dufour, o reconhecimento estaria comprometido.

Na formiga Ponerinae *Pachycondyla apicalis*, observa-se um conjunto de projeções cuticulares basitarsal, onde os hidrocarbonetos são secretados e posteriormente distribuído pelo corpo (SOROKER *et al.*, 2003). Em *Polistes dominulus* são encontradas células secretoras da classe III no fêmur, tíbia, e especialmente no tarso do 3º par de pernas, em ambos os sexos (BENI e CALLONI, 1991 *apud* JEANNE, 1996). A função destas células glandulares ainda não está esclarecida, mas pode estar envolvida nos processos de síntese dos hidrocarbonetos cuticulares. Assim, é bem provável que em *P. versicolor* um processo semelhante possa estar ocorrendo, com a distribuição dos hidrocarbonetos durante os processo de auto-limpeza.

Durante as observações, presenciou-se a emergência simultânea de machos e fêmeas em *P. versicolor*, confirmando o já descrito para esta espécie (MAULE-RODRIGUES, 1968; GOBBI, 1977), e para outras espécies como *P. chinensis antennalis* (MIYANO, 1986) e *P. l. lanio* (GIANNOTTI, 1992). Todavia, as colônias de *P. versicolor* diminuíram a produção de fêmeas durante o período de emergência de machos.

Como nossos dados não abrangem um ciclo completo da colônia de *P. versicolor*, não foi possível o cálculo da produção de machos pela colônia, mas a média de produtividade registrada em colônias de *P. versicolor*, observada por Maule-Rodrigues (1968), foi de 35 machos por colônia, enquanto de *P. ferreri* foi de 18 indivíduos (SINZATO *et al.*, 2003) e *P. chinensis antennalis* de 82 machos (MIYANO, 1983).

A produção de machos na colônia observada deu-se em janeiro, da mesma forma que a observada por Maule-Rodrigues (1968), entretanto a autora acredita ser esta uma produção anômala, pois os machos geralmente



são produzidos no final do outono e princípio de inverno. Apesar da afirmação acima, outros autores acreditam que a produção de machos não seja sincrônica, como observado nas espécies do hemisfério norte por West-Eberhard (1969), Kojima e Suzuki (1986) e Suzuki (1986). Carneiro Silva (1991) estudando *P. versicolor* e Giannotti (1992) com *P. lanio lanio* concluíram que não há época determinada para produção de machos, onde, apesar de ter havido maior produção entre os meses de fevereiro e maio, talvez por anteceder o período de abandono, observa-se, de modo geral, que há disponibilidade de machos ao longo de todo ano para estas espécies. Assim, para *P. versicolor*, apesar de haver maior produção de machos no período que antecede o abandono das colônias, pode haver produção de machos em qualquer período do ciclo colonial, pois a produção destes, somente em alguns casos, marca o final do desenvolvimento da colônia, conferindo com as observações de Maule-Rodrigues (1968) para *P. versicolor* e Morinoto (1954 *apud* MAULE-RODRIGUES, 1968) para *P. chinensis antennalis*. Isto, provavelmente, se deve ao fato de que botar ovos não é uma característica exclusivamente limitada as fêmeas fundadoras, onde operárias não inseminadas podem botar ovos que se desenvolverão em machos (STRAMBI, 1990). Tais fatos, apoiam a idéia de Raposo-Filho (1987) que acredita que a presença constante de machos seja um mecanismo que permite a fecundação de fêmeas durante todo ano, em função da ausência de sincronismo no ciclo biológico das espécies tropicais.

A produção de machos em *P. versicolor* parece ser um processo não obrigatório para as colônias ou que muitas vezes passa despercebido pelos observadores, visto que, das 10 colônias analisadas e das mais de 25 translocadas, apenas em 2 ninhos foi constatada a presença de machos. O mesmo foi registrado por Souza (1998), onde, das 27 colônias de *P. versicolor* estudadas, observou-se a produção de machos em apenas 3 delas. Giannotti (1992) também verificou que, das colônias de *P. lanio lanio* observadas, 13 nunca vieram a produzir machos durante todo seu ciclo. Maule-Rodrigues (1968) separa as colônias de *P. versicolor*, em fase reprodutiva, em colônias macho-produtoras, fêmeas-produtoras e macho-fêmea-produtoras, cujas

diferenças decorrem do grau de dominância e fecundidade das respectivas fêmeas poedeiras. Desta forma, assim como Giannotti (1992), acreditamos que a utilização da terminologia sugerida por Jeanne (1972) no que diz respeito aos subestágios de pré-macho e pós-macho, na pós-emergência das colônias de *Polistes*, fica comprometida nas espécies de clima tropical e subtropical, visto que a produção dos machos parece ser um evento não obrigatório.

Pouco se sabe sobre quanto tempo vive um macho de *Polistes*, após a saída do ninho. Wenzel (1987) observou que muitos machos de *P. major* viveram por volta de dois meses no laboratório, sendo que um deles chegou a cinco meses, mas é claro que a pressão da predação no campo, sem a proteção da colônia, deve antecipar esta expectativa.

Durante o tempo em que os machos de *P. versicolor* permaneceram na colônia, foram observadas 21 categorias comportamentais, agrupadas em 7 classes, descritas a seguir:

#### Atividades ligadas à alimentação:

(TAA) Trofalaxis adulto-adulto - consiste na transferência oral de regurgitado líquido de uma fêmea forrageira para um macho. O macho solicitante geralmente toca com as antenas em movimentos rítmicos rapidamente na cabeça da outra vespa durante a transferência, sendo esta talvez uma forma de comunicação entre os indivíduos, da mesma forma que observado entre as fêmeas (WEST-EBERHARD, 1969; GIANNOTTI e MACHADO, 1999).

(TLA) Trofalaxis larva-adulto – geralmente, um macho verificando as células, insere sua cabeça nas células onde se encontram as larvas, podendo ficar ai por vários segundos. O indivíduo executa tal comportamento para solicitar a secreção salivar larval (ZARA e BALESTIERI, 2000), nutritiva e bastante atrativa para os adultos (HUNT, 1991). Aparentemente nem todas as larvas oferecem sua secreção, pois enquanto o adulto procura, verifica várias células com larvas até encontrar alguma que atenda ao pedido.

- (RP) Receber presa – quando uma forrageira chega ao ninho com presa, rapidamente é interceptada por um macho que recebe parte ou toda presa macerada. Aparentemente não há contato físico, para comunicação, entre os indivíduos. Após receber a presa, esta é mastigada e, provavelmente, ingerida, pois não se observou repasse para outro indivíduo adulto ou larva. Entretanto, Souza (1998), notou a participação de machos nas atividades de recepção, maceração de presas e alimentação das larvas, em *P. versicolor*, comportamentos que foram também observados em machos de outras espécies como *P. major* (CAMERON, 1986), *P. instabilis* (O'DONNELL, 1995), *P. jadvigae* (MAKINO, 1993) e *P. l. lanio* (GIANNOTTI, 1992).
- (MP) Mastigar presa – assim que recebe uma presa, o indivíduo manipula a massa macerada por entre as mandíbulas. Com passar do tempo, observa-se que a massa diminui de diâmetro, levando a crer que esteja havendo ingestão da presa ou ao menos de fluídos deste macerado, enquanto a mastiga. Não raramente, a massa era processada até seu total desaparecimento por entre as mandíbulas e não se observou repasse deste material para outro indivíduo adulto ou larva. Makino (1993) verificou que os machos de *P. jadvigae* passam mais tempo macerando que as fêmeas e geralmente alimentam apenas uma larva, quando o fazem, levando a crer também que esteja havendo ingestão de parte da presa.
- (VC) Verificar células – a vespa caminha pelo ninho inserindo a cabeça por poucos segundo em cada célula. Nos machos este comportamento antecede a trofalaxia larva-adulto, logo estando relacionado à localização de larvas que disponibilizem sua secreção nutritiva e, portanto, à sua própria alimentação. Em apenas um caso um macho ofereceu alimento líquido para larva, precedido pela verificação de células.

### **Atividade ligada ao cuidado com a prole**

- (LL) Oferecer alimento líquido para larva - quando um macho oferece para larva alimento líquido regurgitado. Este foi um comportamento bastante raro em *P. versicolor*, mas que demonstra a participação de machos em atividades de cuidado com a prole. Comportamentos relacionados à alimentação da prole já foram observados em diversas espécies de *Polistes* como *P. versicolor* (SOUZA, 1998), *P. major* (CAMERON, 1986), *P. instabilis* (O'DONNELL, 1995), *P. jadvigae* (MAKINO, 1993) e *P. l. lanio* (GIANNOTTI, 1992).

### **Atividade relacionada à manutenção do ninho**

- (AI) Dar alarme – consiste em suspender o corpo sobre as pernas, abrir as asas e se voltar para a fonte de distúrbio, ficando, posteriormente, em alerta e estáticos. Tal comportamento é basicamente idêntico ao apresentado pelas fêmeas, sendo que o mesmo também foi observado em machos de *P. lanio lanio* (GIANNOTTI, 1992). O alarme era desencadeado quando o observador chegava muito próximo ou tentava-se retirar as recém emergidas para marcação. Vespas parasitóides (Ichneumonidae) tentando se aproximar do ninho, também desencadeavam o comportamento de alarme. Apesar dos machos apresentarem sempre o comportamento de alarme, não foi possível determinar com precisão se o alarme dado pelo macho atraía a atenção das fêmeas, pois freqüentemente ambos realizavam tal comportamento simultaneamente. Esta observação seria importante, pois feromônios de alarme foram identificados como componentes do veneno em *P. canadensis*, (JEANNE, 1982), sendo assim exclusivos das fêmeas. Entretanto, Maschwitz (1964 *apud* JEANNE, 1996) acredita que em *Polistes*, apenas a comunicação mecânica, por meio do zumbido das asas, já desencadeia o comportamento de alarme, sem a necessidade de um sinal químico. Assim, caso o macho seja capaz de alarmar suas companheira de colônia, o que acreditamos ser verdade, provavelmente

a comunicação sonora prevalece sobre a química. Por fim, caso os machos não sejam capazes de iniciar o alarme, pode-se ao menos afirmar que são capazes de reconhecê-los, sejam eles sinais químicos ou mecânicos, e participar do comportamento. Apesar dos machos não apresentarem um aparato de ferrão para defesa da colônia, possivelmente a participação no comportamento de alarme possua um efeito visual e sonoro (zumbido das asas) sobre o predador.

#### **Atividade ligada às relações hierárquicas**

- (S) Comportamento de subordinação – o macho aceita as agressões por parte de determinada fêmea, ficando abaixado e estático. A agressão se caracterizou como mordidas e puxões das pernas. Novamente este foi um comportamento bastante raro. Mesmo durante o processo de substituição de dominante, quando a fêmea substituta, para demonstrar sua nova condição, agredia todas as demais fêmeas, nada fazia aos machos que se mantinham na frente do ninho.

#### **Atividades relacionadas à reprodução**

- (AS) Andar no substrato – consiste no indivíduo caminhar no substrato em que o ninho estava fixado, afastando-se no máximo 15 cm do ninho. Caminhar pelo substrato não é comumente realizado pelas fêmeas, tendo sido observado apenas durante a fase de pré-emergência (SINZATO e PREZOTO, 2000), provavelmente pelo fato do ninho ainda ser pequeno para abrigar todas as fêmeas associadas. Na maioria das vezes em que o macho caminhava no substrato, observava-se que o mesmo podia tatear o substrato com as antenas, esfregar o gaster, as peças bucais e, quando parava, regurgitar uma gota de secreção que era depositada no substrato. Não havia uma seqüência ou obrigatoriedade de realização destes comportamentos durante a caminhada. Não incomum, o macho podia alçar vôo a partir do substrato. O fato deste comportamento estar associado à provável

liberação de feromônios, possivelmente para demarcação de território, nos fez enquadrá-lo como relacionado as atividades de reprodução.

- (AS) Antenar o substrato – Enquanto o macho anda pelo substrato ou pelo ninho, antena-o como se procurando algo. Pode desenvolver trajetórias ao acaso e em ziguezague curto. Este foi um comportamento observado com maior frequência acontecendo no substrato de fixação do ninho, mas em 2 casos observou-se o mesmo ocorrendo na face posterior do favo.
  
- (SO) Aplicar secreção oral – consiste no macho caminhar esfregando as peças bucais no substrato. Foi observado com maior frequência ocorrendo junto ao substrato onde o ninho encontra-se fixado, mas também foi realizado na face posterior do favo. Wenzel (1987) estudou mais detalhadamente tal comportamento em *P. major*, onde observou que o macho abaixa sua face até que o cípeo e as mandíbulas ainda fechadas tocassem o substrato, caminhando nesta posição por vários centímetros, por aproximadamente 1 segundo. Devido ao tamanho das glândulas ectomandibulares dos machos de *P. major* e *P. fuscatus*, tanto Wenzel (1987) quanto Landolt e Akre (1979), respectivamente, sugerem que seja sua secreção a liberada durante este comportamento. Posteriormente, Reed e Landolt (1990) demonstraram que fêmeas virgens são atraídas pela secreção da glândula ectomandibular de machos de *P. fuscatus*, de onde pode-se concluir que o comportamento de depositar secreção oral está relacionado a atração sexual. Entretanto, pouco se sabe a respeito das demais glândulas nos machos, que também podem estar envolvidas nestes e em outros comportamentos.
  
- (SG) Aplicar secreção gastral – enquanto caminha, o macho esfrega a região ventral do gaster no substrato. Novamente tal comportamento foi observado ocorrendo com maior frequência no substrato, mas também ocorreu na face posterior do ninho. Podia ainda bater as asas como se

dispersando o feromônio aplicado. Segundo Landolt e Akre (1979), os machos de *Polistes* apresentam glândulas ligadas ao 6º e 7º segmentos esternais, sendo esta última particularmente denominada glândula de Van der Vecht. Wenzel (1987) acredita que as glândulas esternais de *P. major*, bem como em outras espécies de *Polistes*, estejam envolvidas em marcação de território. A marcação de território por machos de *Polistes* já foi descrita e demonstrada para diversas espécies (TURILLAZZI e CERVO, 1982; POST e JEANNE, 1983a, b; WENZEL, 1987; BEANI e TURILLAZZI, 1988; REED e LANDOLT, 1990).

- (R) Regurgitar – Quando parado, o macho começa a regurgitar uma gotícula líquida escura que segurava por entre as mandíbulas, sendo depois depositada sobre o substrato. Pode-se observar que os indivíduos podiam ficar por vários minutos com a gotícula, parados. Em alguns casos a gotícula regurgitada aumentava até aproximadamente o tamanho da cabeça do indivíduo e podia ser reabsorvida para iniciar tal comportamento logo depois em outro local. Diferentemente de *P. versicolor*, que sempre depositou o regurgitado no substrato, Sinzato e Prezoto (2000) observaram machos de *P. ferreri* jogar a gotícula para fora do ninho, como uma forma de excreção. A função deste comportamento ainda não está clara.
- (BA) Bater as asas – quando a vespa bate as asas sem alçar vôo, provocando deslocamento de ar. Diferentemente das fêmeas, onde tal comportamento está relacionado ao resfriamento do ninho (GIANNOTTI e MACHADO, 1999), foram observados machos executando-o em dias chuvosos e frios. Logo acreditamos estar envolvido na dispersão de feromônios. Assim, apesar de denominado ventilar ninho por outros autores, a exemplo do que fazem as fêmeas, sugerimos a alteração do nome, por não estar relacionado à termorregulação da colônia. Este comportamento é exibido por machos de outras espécies, como *P.*

*ferreri* (SINZATO e PREZOTO, 2000), *P. major* (CAMERON, 1986) e *P. l. lanio* (GIANNOTTI, 1992).

- (Vo) Sair voando – Alçar vôo a partir do ninho ou substrato. Geralmente retornava ao ninho sem nada entre as mandíbulas e não realizava trofalaxia com adultos ou larvas. Alguns indivíduos não retornavam, o que foi interpretado como abandono do ninho ou predação. Este comportamento também foi descrito por outros autores, para machos de outras espécies de *Polistes*, porém como forrageamento infrutífero (GIANNOTTI, 1992; SINZATO *et al.*, 2003). Sinzato *et al.* (2003) sugerem que estes vôos estejam relacionados à procura de alimento para suprir suas necessidades individuais. O'Donnell (1995) até observou dois machos de *P. instabilis* trazendo néctar e fazendo trofalaxia com uma fêmea subordinada. Entretanto, diferente do observado em *P. ferreri*, onde os machos são alimentados poucas vezes pelas fêmeas, que os atacam, forçando-os a se abrigarem na face posterior do favo (SINZATO *et al.*, 2003), os machos de *P. versicolor* são freqüentemente alimentados, pois recebem a secreção larval e presas trazidas pelas forrageiras, além de raramente sofrerem agressão por parte das fêmeas. Desta forma, acreditamos que o comportamento de alçar vôo possa estar mais relacionado a vôos de reconhecimento e/ou para deposição de feromônios para atração sexual e demarcação de territórios.
- (TC) Tentar copular – o macho aproxima-se da fêmea, antenando com ela e realizando *allogrooming*. Ele fica pareado com a fêmea e tenta subir em seu dorso com as pernas dianteiras, mas a fêmea sai andando, sem deixar o macho realizar a cópula. Em nenhuma das vezes em que houve uma tentativa de cópula, observou-se agressão nem por parte das fêmeas, nem pelos machos.



- (C) Cópula - o macho aproxima-se da fêmea, antenando com ela e realizando *allogrooming*. O macho toma então uma posição lateral a fêmea e sobe em seu tórax com as pernas dianteiras, virando o gaster por debaixo dela. A fêmea levanta levemente seu gaster, facilitando para o macho pariar as aberturas genitais. O macho, então, projeta seu aparelho reprodutor e o encaixa na abertura da fêmea. O macho projeta e retrai seu aparelho reprodutor seis vezes. Sem sair de cima da fêmea, dá uma pausa de poucos segundos e repete os mesmos movimentos mais seis vezes, para então liberá-la.

### **Inatividade**

- (Im) Imóvel – o indivíduo fica, aparentemente, estático, sobre o ninho. Este comportamento ocorre com maior frequência na região posterior do ninho. É o comportamento mais executado pelos machos (73.55%). Segundo Wenzel (1987) os machos de *P. major* apresentam pouco corpo gorduroso e um alto custo metabólico para manutenção de suas atividades. Assim, os longos períodos de inatividade podem ser interpretados como uma forma de economia de energia.

### **Atividades não específicas ou sem função conhecida**

- (An) Andar – a vespa macho anda no ninho sem realizar qualquer atividade aparente, que não seja para se deslocar de um ponto a outro.
- (AL) Autolimpeza (*autogrooming*) – a vespa macho se limpa passando as pernas pelo corpo, antenas, uma contra as outras e lambendo as pernas anteriores. Não há sincronia entre as regiões a serem limpas, assim como observado nas fêmeas (ZARA E BALESTIERI, 2000). É um comportamento muito executado por todas as vespas. Nas regiões sensoriais a autolimpeza é facilmente entendida como uma forma de manter desobstruídas as áreas receptoras. Talvez no restante do corpo, além da limpeza propriamente dita, esteja relacionado, de alguma forma,

com a manutenção e distribuição de ferômonios e hidrocarbonetos cuticulares pelo corpo.

(Alo) *Allogrooming* – uma vespa lambe a outra, ou limpa uma a outra, principalmente na região da cabeça e tórax. Tal comportamento já foi observado em *P. versicolor* (CARNEIRO SILVA, 1991) e *P. ferreri* (SINZATO *et al.* 2003). Para Sinzato *et al.* (2003), no *allogrooming*, um indivíduo é apenas limpo por outro, sugerindo uma interação social. Carneiro Silva (1991) já acredita que o *allogrooming* sirva para impregnar os indivíduos com o odor da colônia. Em Vespinae, tal comportamento também está relacionado à passagem de feromônios (EDWARDS, 1980). Algumas espécies do gênero *Vespa* antenam e lambem o corpo da rainha de suas colônias, para captarem a substância de rainha, o que é muito similar à corte real das abelhas (MATSUURA, 1984). Assim, no caso dos machos de *P. versicolor*, muito provavelmente este comportamento também esteja relacionado a algum processo de troca de feromônios, mas não há ainda uma explicação sobre a real função do *allogrooming* nas espécies primitivamente eussociais.

Ao todo 21 atos comportamentais foram registrados para os machos de *P. versicolor*. Giannotti (1992) quantificou 12 atos comportamentais exibidos pelos machos de *P. l. lanio*, enquanto Sinzato *et al.* (2003) observaram 17 atos comportamentais para *P. ferreri*. Todavia, a divisão, definição e agrupamento dos comportamentos é uma atividade bastante arbitrária, tornando a comparação apenas numérica dos atos algo pouco relevante.

Os machos de *P. versicolor* apresentam-se, na maior parte do tempo, imóveis (73,55%), como relatado também por Valadão (1986), estando o restante do tempo envolvidos principalmente com alimentação e reprodução. O comportamento ficar imóvel foi o mais freqüente também em *P. ferreri* (82,21%) (SINZATO e PREZOTO, 2000) e *P. lanio lanio* (82.8%) (GIANNOTTI, 1992).

**Tabela 1** Frequências comportamentais de machos de *P. versicolor*

<b>Comportamentos</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Trofalaxis adulto-adulto	20	2,37
Trofalaxis larva-adulto	21	2,49
Receber presa	9	1,07
Mastigar presa	6	0,71
Verificar células	23	2,73
Oferecer alimento líquido p/ larva	1	0,12
Dar alarme	2	0,24
Andar no substrato	3	0,36
Antenar o substrato	3	0,36
Aplicar secreção oral	1	0,12
Aplicar secreção gastral	1	0,12
Regurgitar	7	0,83
Bater as asas	17	2,02
Tentativa de cópula	5	0,59
Cópula	2	0,24
Sair voando	2	0,24
Subordinação	2	0,24
Permanecer imóvel no ninho	620	73,55
Autolimpeza	65	7,71
Andar	11	1,30
<i>Allogrooming</i>	22	2,61
Soma	843	100

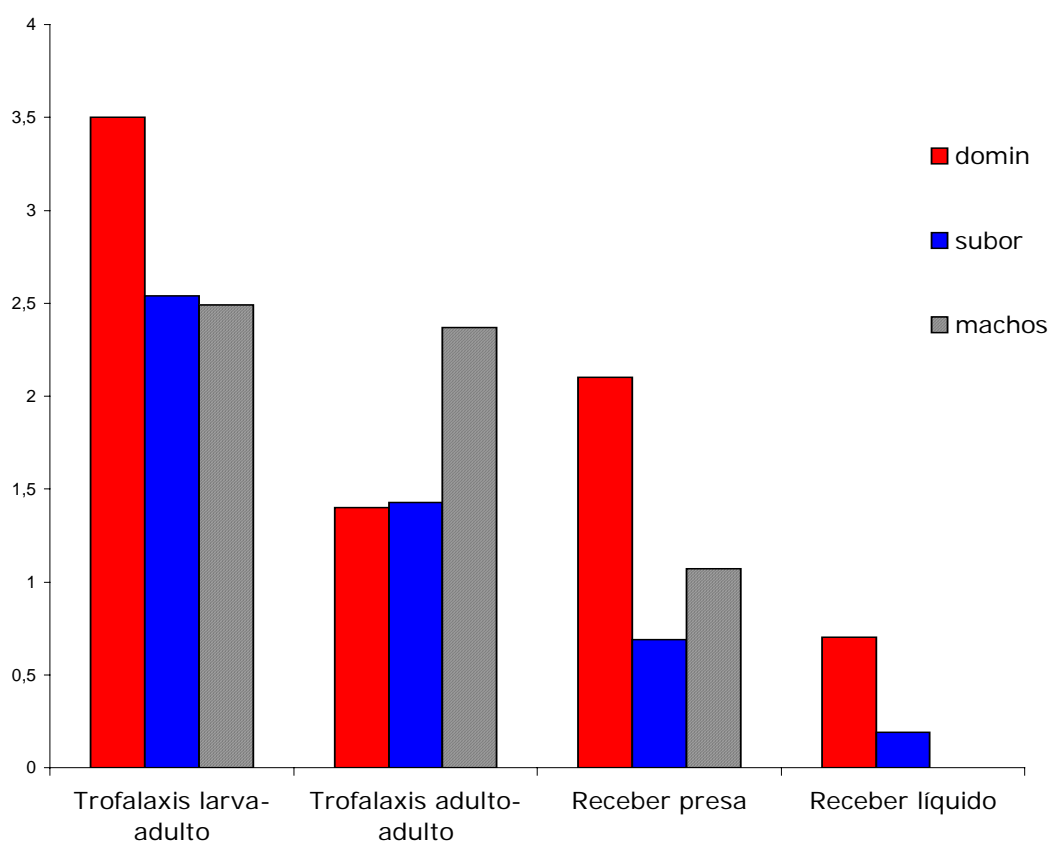
Segundo Sinzato e Prezoto (2000) os machos de *P. ferreri* apresentam um comportamento denominado, por estes autores, como contato, onde o macho é arrastado por outra vespa fêmea ou quando ele tem parte do seu corpo (antena, pernas ou asas) agarrado entre as mandíbulas de uma companheira de ninho. Em *P. versicolor* observou-se um episódio semelhante,

onde o macho começava sair do ninho e caminhar pelo substrato quando uma fêmea o agarrou pela perna traseira com as mandíbulas, como se tentando segurá-lo no ninho. Posteriormente, o macho abandonou o ninho. Numa segunda ocasião um comportamento semelhante foi observado, porém com maior agressividade, o que nos fez considerar tais eventos como atos de subordinação. Para Sinzato e Prezoto (2000) o contato pode estar ligado a hierarquia de dominância, o que consideramos não ser muito diferenciado da subordinação.

Observou-se que boa parte dos comportamentos executados está relacionado à alimentação. Em uma comparação com as fêmeas, num mesmo período, os machos solicitam secreção larval e recebem presas de subordinadas forrageira em quantidade próxima ou superior à própria dominante (Fig. 1). O'Donnell (1999) também observou machos de *Mischocyttarus mastigophorus* consumindo grandes quantidades de alimento. Já Wenzel (1987) observou que os machos de *P. major* apresentam pouco corpo gorduroso e um alto custo metabólico para manutenção de suas atividades, o que pode explicar o porquê desta elevada demanda de alimento. Hunt (1991) supõe que devido a sua anatomia, as vespas são restritas a uma dieta líquida, como a saliva larval, regurgitado de outro adulto coespecífico e hemolinfa da presa macerada. Entretanto, pode-se observar ocasiões em que os machos manipularam o macerado até ser completamente absorvido. Pode-se ainda constatar a presença de alimento sólido no papo de machos e fêmeas, e em apenas um caso observou-se o macho cedendo alimento líquido para larva, apesar deste último comportamento já ter sido observado em machos de outras espécies, como relatada por Hunt e Noonan (1979) em *P. fuscatus* e *P. metricus*, por Makino (1983) em *P. biglumis* e por Cameron (1986) em *P. major*. Desta forma, põe-se em questão a real capacidade de indivíduos adultos poderem ou não ingerir alimento sólido. Acreditamos que apesar de realmente haver limitações anatômicas quanto à espessura do esôfago das vespas, estes indivíduos podem processar o alimento sólido de modo a permitir sua passagem.

Os machos de *P. versicolor* também exibiram comportamentos que confirmam sua participação no cuidado da cria e manutenção do ninho (Tab. 1), como alimentar a cria e dar alarme, similar ao observado em *P. versicolor* (Valadão, 1986), *P. ferreri* (Sinzato *et al.*, 2003), *P. l. lanio* (Giannotti, 1992) e *Mischocyttarus cerberus styx* (Noda *et al.* 2001).

**Figura 1** Comparação da porcentagem da freqüência de comportamentos ligados a alimentação de dominantes, subordinadas e machos de uma colônia em final de ciclo de *Polistes versicolor*.



O comportamento reprodutivo dos machos de *P. versicolor* engloba uma série de atos independentes, provavelmente relacionados a corte e/ou atração química. Na seqüência comportamental completa o macho caminhava pelo substrato, na região próxima ao ninho. Conforme caminhava, tocava com suas antenas no substrato, como se procurando um local ideal. Ainda andando, esfregava o gaster no substrato, podendo bater as asas ao mesmo tempo. Assim que se afastava do ninho, entre 10 e 15cm, regurgitava uma gotícula escura que segurava com as mandíbulas, de poucos segundos a até 20

minutos. A gota era então depositada no substrato e o macho saía voando. Ao retornar, o macho aproximava-se da fêmea e tentava a cópula propriamente dita, tocando seu corpo com as antenas (antenando) e realizando *allogrooming*. O macho tomava então uma posição lateral à fêmea e subia em seu dorso (tórax) com as pernas dianteiras, virando o gaster por debaixo dela, que também levantava levemente seu gaster, facilitando para o macho alinhar as aberturas genitais, como anteriormente descrito nos atos comportamentais. Após a cópula, cada indivíduo foi para um lado do ninho e começaram a realizar autolimpeza. Na seqüência o macho bateu as asas sem alçar vôo enquanto a fêmea permaneceu imóvel.

A cópula propriamente dita durou de 30 a 40 segundos, ocorrendo sobre o ninho, na região frontal do mesmo. Gobbi (1977) também observou cópulas em *P. versicolor* que duraram entre 17 e 60 segundos. A duração da cópula em *P. l. lanio* é em média de 35 segundos (GIANNOTTI, 1992), enquanto *P. fuscatus* de 20 a 30 segundos (WEST-EBERHARD, 1969).

O comportamento de cópula foi realizado por dois machos distintos, e houveram ainda cinco tentativas frustradas, por estes e outros machos. Os machos que apresentaram comportamento de cópula ou tentativa de cópula tinham de dois a cinco dias no ninho. Entretanto, as observações de Gobbi (1977) sugerem que os machos de *P. versicolor* começaram a se interessar pelas fêmeas ao redor dos dez dias de idade e se tornaram sexualmente maduros apenas após 16 dias. Todavia, segundo Caetano *et al.* (2002), os machos de todo Hymenoptera já apresentam o testículo em avançado estágio de histólise ao emergirem, pois todo processo de espermiogênese e espermatogênese ocorre durante a pupação. Assim, os machos apresentam-se fisiologicamente prontos para cópula já no primeiro dia de vida pós-metamorfose. Logo, a cópula observada tardiamente por Gobbi (1977) pode estar relacionada a outros fatores, por exemplo, climáticos, diferente das condições durante nossas observações.

Como já mencionado por Maule-Rodrigues (1968), e assim como em *P. ferreri* (SINZATO *et al.*, 2003), os machos de *P. versicolor* copularam com as fêmeas do mesmo ninho. Ryan e Gamboa (1986 *apud* REEVE, 1991)

verificaram que machos e fêmeas aparentadas copulam mais freqüentemente entre si do que os não aparentados, enquanto Giannotti (1992) relata que as observações de cópula entre irmãos, em *P. l. lanio* não foram freqüentes, concluindo que este seja apenas um comportamento esporádico e não regra geral. De qualquer maneira, Sinzato *et al.* (2003) acredita que a cópula entre irmãos está relacionada à acessibilidade das fêmeas do ninho, uma vez que, quando eles abandonam a colônia, a oportunidade dos machos de copular diminui, apesar de Wenzel (1987) ter observado machos de *P. major*, que, fora das colônias natais, marcavam e defendiam áreas para atração das fêmeas, onde possivelmente também copulavam.

Apesar de não se saber a freqüência com que os machos copulem fora do ninho, sabe-se que, em *P. versicolor*, as cópulas ocorrem antes da formação dos agregados de inverno (GOBBI, 1977), onde a porcentagem de fêmeas fecundadas varia entre 50%, como observado por Maule-Rodrigues (1968), e 75%, por Gobbi (1977).

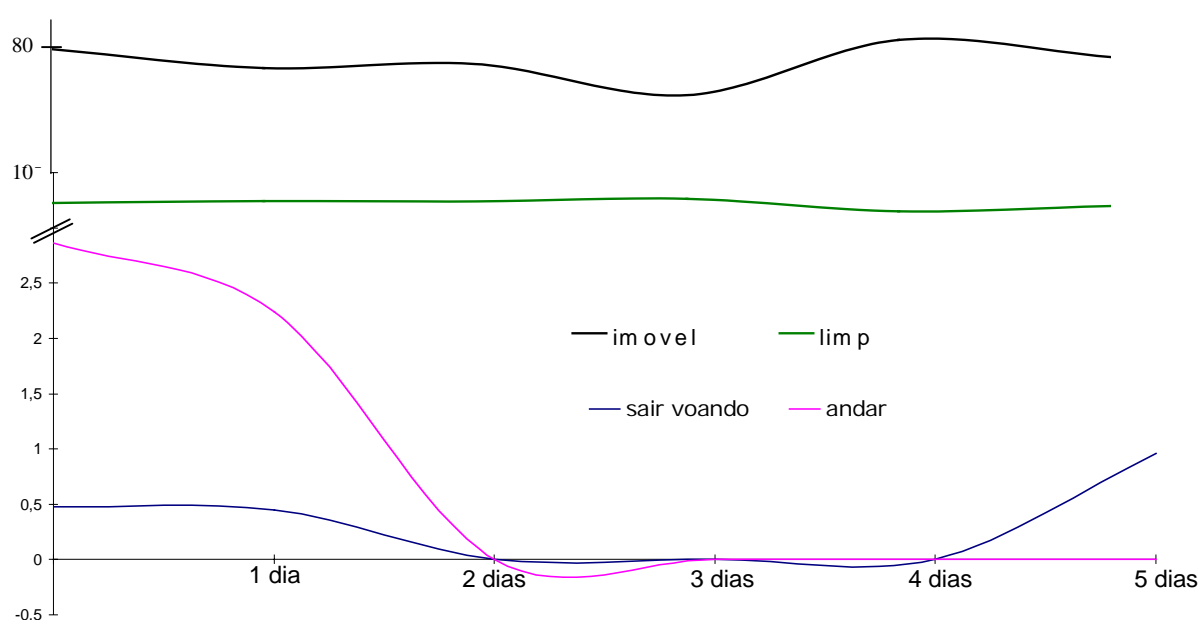
Outro ponto interessante é que as cópulas observadas se deram sempre com fêmeas subordinados, sendo uma delas uma eficaz forrageira. Para Post e Jeanne (1985 *apud* CARNEIRO SILVA, 1991) o fato dos machos de *P. fuscatus* não distinguirem entre as castas de fêmeas e haver atratividade das operárias pelos machos é, em parte, um reflexo do nível primitivo da socialidade em *Polistes*.

Apesar de não termos visto um mesmo macho copulando duas vezes, pode-se observar machos que após uma cópula tentavam outra, com novas fêmeas, e assim supor-se que um macho pode realizar mais de uma cópula. Maule-Rodrigues (1968) também apoia a idéia de que os machos possam fecundar mais de uma fêmea, apoiando-se na razão sexual, que é de 2.34 fêmeas para 1 macho em *P. versicolor*.

Se compararmos as atividades realizadas pelos machos, de acordo com a idade notaremos que andar no ninho, permanecer imóvel e autolimpeza, permaneceram basicamente constantes, independente da idade e do indivíduo (Fig. 2).

Sair voando foi mais freqüente no 1º e 5º dia de vida adulta (Fig. 2). Isto se deve a duas ondas de abandono do ninho nestas duas idades. Não se observou razão aparente que defina os machos que saem e os que ficam, pois em certa ocasião, de dois machos que emergiram no mesmo dia, um ficou e o outro imediatamente abandonou o ninho. Permanecer no ninho garante proteção, microclima favorável e alimentação, além de possibilitar a cópula com suas companheiras de ninho, entretanto pouco se sabe das vantagens de se deixar a colônia mãe. Segundo alguns autores, quando um macho parte, provavelmente fica em locais de fundação ou refúgios naturais, que ofereçam proteção (BEANI e TURILLAZZI, 1988; GIANNOTTI, 1992). A afirmação acima parece se enquadrar melhor àquelas espécies de clima temperado e assim, as opções mais coerentes para *P. versicolor* seriam associar-se a uma nova colônia, como observado em *P. ferreri* (SINZATO e PREZOTO, 2000) ou demarcar áreas com feromônios de tração sexual e executar patrulhadas constantemente (WENZEL, 1987; POST e JEANNE, 1983b).

**Fig. 2** Representação gráfica da relação entre o número de comportamentos observados e a idade dos machos de *Polistes versicolor*.

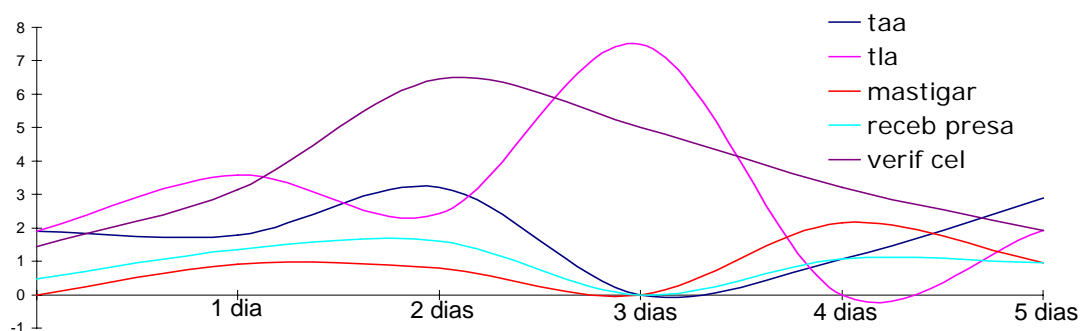


As atividades relacionadas à alimentação, como a trofalaxia com adulto, receber e mastigar presa, apresentaram-se constantes ao longo da vida



intranidal dos machos (Fig. 3). Já verificar célula e realizar trofalaxia com larva apresentou um pico de frequência no 3º dia, normalizando logo depois (Fig. 3).

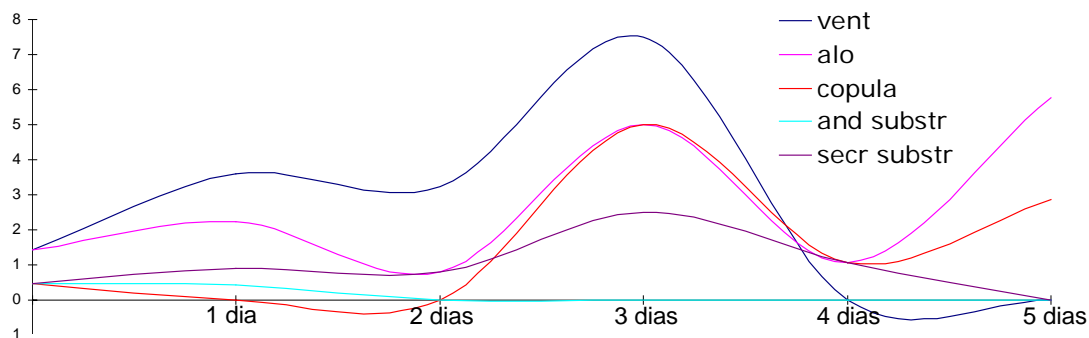
**Fig. 3** Representação gráfica do número de comportamentos observados, ligados à alimentação pela idade dos machos de *Polistes versicolor*.



Leg. taa = trofalaxia adulto adulto; tla = trofalaxia larva adulto; mastigar = mastigar presa; receb presa = receber presa; verific cel = verificar célula.

Quando comparado com outros fatores, pode-se notar que o pico coincide com a redução das atividades de coleta pelas subordinadas forrageira, devido às condições climáticas desfavoráveis, o que acabou por refletir na ausência de recebimento de presas e trofalaxia com adulto. Assim, tal variação com a idade não reflete a realidade, uma vez que, provavelmente, a verificação de célula e a trofalaxia com larva são também atividades constantes, servindo como fonte alternativa de alimento em momentos de necessidade.

**Fig. 4** Representação gráfica do número de comportamentos observados ligados à reprodução pela idade dos machos de *Polistes versicolor*.



Leg.: vent = bater as asas; alo = *allogrooming*; and substr = andar no substrato; secr substr = depositar secreção no substrato

As cópulas foram mais freqüentes no 3<sup>o</sup> dia de vida dos machos (Fig. 4). Apenas o comportamento de andar no substrato não apresenta relação com a idade, possivelmente por não haver necessidade de sair do ninho para copular. Observou-se ainda que no quarto dia as atividades decaem (Fig. 4), mas acreditamos ser tal fato decorrente do reduzido número amostral e pela coincidência com dias em que os fatores climáticos encontravam-se desfavoráveis. No 5<sup>o</sup> dia as atividades voltaram a subir (Fig. 2.4), porém nenhum macho ficou mais que cinco dias nos ninhos.

Por fim, fica claro que os machos constituem um custo bastante elevado para colônia, por consumirem grande quantidade de recursos alimentares conseguidos pelas forrageiras e por apresentarem uma contribuição na manutenção da colônia e cuidado com a cria bastante reduzido, além de fecundar fêmeas forrageiras que dificilmente formarão novas colônias, constituindo um investimento perdido. Possivelmente, pelo alto custo energético para colônia, o tempo de permanência destes indivíduos seja tão reduzido, afim de não causar danos ao desenvolvimento colonial. Mas por outro lado, não se pode descartar a hipótese de O'Donnell (1999) que acredita que os machos de *M. mastigophorus*, que também realizavam tarefas de manutenção do ninho, em baixa freqüência, não forrageavam, mas consumiam quantidades desproporcionais de alimento, são assim tratados para aumentar seu tempo de vida e permanência dos mesmos na colônia, o que acreditam ser vantajoso para espécies tropicais.

## Bibliografia

- ALTMANN, J. Observational study of behaviour: Sampling methods. **Behaviour**, Leiden, v. 49, p. 227-267, 1974.
- BEANI, L.; TURILLAZZI, S. Alternative mating tactics in males of *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 22, p. 257-264, 1988.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. **Formigas: biologia e anatomia**. Araras: Gráfica e Editora Topázio, 2002.
- CAMERON, S. A. Brood care by males of *Polistes major* (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v. 59, n. 1, p. 183-185, 1986.
- CARNEIRO SILVA, A. **Determinação do sistema de substituição de fêmeas dominantes em colônias de *Polistes* (Vespidae - Polistinae)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1991.
- CASTELLÓN, E. G. Evidências sobre o comportamento de cópula dos machos de *Synoeca surinama* L. (Hymenoptera: Vespidae) num ninho em construção. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 3, p. 665-666, 1982.
- DANI, F. R.; MORGAN, E. D.; TURILLAZZI, S.; Dufour's gland secretion of *Polistes* wasps: chemical composition and the possible involvement in nestmate recognition (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 42, p. 541-548, 1996.
- EDWARDS, R. **Social wasps - their biology and control**. Rentokil Limited, 1980.
- GAMBOA, G. J. Kin recognition in social wasps. In: TURILLAZZI, S.; WEST-EBERHARD, M. J. (Org.) **Natural history and the evolution of the paper wasps**. Oxford: Oxford University Press, 1996.
- GAMBOA, G. J.; KLAHN, J. E.; PARMAN, A. O.; RYAN, R. E. Discrimination between nestmate and non-nestmate kin by social wasps (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera; Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 21, p. 125-128, 1987.
- GAMBOA, G. J.; REEVE, H. K.; FERGUSON, I. D.; WACKER, T. L. Nestmate recognition in social wasp: the origin and acquisition of recognition odours. **Animal Behaviour**, London, v. 34, p. 685-695, 1986.
- GERVET, J.; PRATTE, M.; GABOURIAT, D. Duree de vie individuelle chez le *Polistes* – consequences ecoethologiques (Hymenoptera, Vespidae). **Actes Cool. Insectes Soc**, v. 2, p. 281-291, 1985.
- GIANNOTTI, E. **Estudos biológicos e etológicos da vespa social neotropical *Polistes (Aphanilopterus) lanio lanio***. Tese (Doutorado em Zoologia), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1992.

- GIANNOTTI, E., MACHADO, V. L. L. Behavioral castes in the primitively eussocial wasp *Polistes lanio lanio*. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.43, p. 185-90, 1999.
- GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor***. Tese (Doutorado em Genética), USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1977.
- HUNT, J. H. Nourishment and the evolution of the social Vespidae. In: ROSS, K. G.; MATTHEWS, R. W. **The Social Biology of Wasps**. New York: Cornell University Press, 1991.
- HUNT, J. H.; NOONAN, K. C. Larval feeding by male *Polistes fuscatus* and *Polistes metricus* (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 26, n. 3, p. 247-251, 1979.
- JEANNE, R. L. Social biology of the neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, Cambridge, v. 114, p. 63-150, 1972.
- JEANNE, R. L. Evidence for an alarm substance in *Polistes canadensis*. **Experimentia**, Basel, v. 38, p. 329-330, 1982.
- JEANNE, R. L. The evolution of the exocrine gland function in wasps. In: TURILLAZZI, S.; WEST-EBERHARD, M. J. (Org.) **Natural History and Evolution of Paper Wasps**. Oxford: Oxford University Press, 1996.
- KOJIMA, J.; SUZUKI, T. Timing of mating in five Japanese Polistine wasps (Hymenoptera, Vespidae): anatomy of fall females. **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v. 59, n. 2, p. 401-402, 1986.
- LANDOLT, P. J.; AKRE, R.D. Occurrence and location of exocrine glands in some social Vespidae (Hymenoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 72, n. 1, p. 141-148, 1979.
- LORENZI, M. C.; BAGNÈRES, A. G.; CLÉMENT, J. L.; TURILLAZZI, S. *Polistes biglumis bimaculatus* epicuticular hydrocarbons and nestmate recognition (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 44, p. 123-138, 1997.
- MAKINO, S. Larval feeding by *Polistes biglumis* males (Hymenoptera, Vespidae). **Kontyu**, Mito, v. 51, n. 3, p. 487, 1983.
- MATSUURA, M. Comparative biology of the five Japanese species of the genus *Vespa* (Hymenoptera, Vespidae). **The Bulletin of the Faculty of Agriculture**, Mie University, Tsu, n. 69, p. 1-131, 1984.
- MAULE-RODRIGUES, V. **Estudo sobre vespas sociais do Brasil (Hymenoptera, Vespidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Rio Claro, 1968.
- MIYANO, S. Number of offspring and seasonal changes of their body weight in a paperwasp, *Polistes chinensis antennalis* Pérez (Hymenoptera:

- Vespidae), with reference to male production by workers. **Researches on Population Ecology**, Tokyo, v. 25, p. 198-209, 1983.
- MIYANO, S. Colony development, worker behavior and male production in orphan colonies of a Japanese paper wasp, *Polistes chinensis antennalis* Perez (Hymenoptera, Vespidae). **Researches on Population Ecology**, Tokyo, v. 28, p. 347-361, 1986.
- NODA, S. C. M.; SILVA, E. R.; GIANNOTTI, E. Dominance Hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3B, p. 603-614, 2001.
- O'DONNELL, S. Division of labor in post-emergence colonies of the primitively eusocial wasp *Polistes instabilis* de Saussure (Hymenoptera: Vespidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 42, p. 17-29, 1995.
- O'DONNELL, S. The function of the male dominance in the eusocial wasp *Mischocyttarus mastigophorus* (Hymenoptera, Vespidae). **Ethology**, Berlin, v. 105, p. 273-282, 1999.
- PFENNIG, D. W.; REEVE, H. K.; SHELLMAN, J. S. Learned component of the nestmate discrimination in workers of a social wasp *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). **Animal Behaviour**, London, v. 31, p. 412-416, 1983a.
- PFENNIG, D. W.; GAMBOA, G. J.; REEVE, H. K.; SHELLMAN-REEVE, J.; FREGUSON, T. D. The mechanism of nestmate discrimination in social wasps (*Polistes*, Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 13, p. 299-305, 1983b.
- POST, D. C.; JEANNE, R. L. Sternal glands in males of six species of *Polistes* (*Fuscopolistes*) (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v. 53, n. 1, p. 32-39, 1983a.
- POST, D. C.; JEANNE, R. L. Male reproductive behavior of the social wasp *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). **Zeitschrift für Tierpsychologie**, Berlin, v. 62, p. 157-171, 1983b.
- RAPOSO-FILHO, J. R. Atividade dos machos de *Mischocyttarus* (*Monocyttarus*) *extinctus* Zikán, 1935 (Vespidae – Polistinae). **Bol. I.C.B.G.**, v. 40, p. 17-23, 1987.
- REED, H. C.; LANDOLT, P. J. Sex attraction in paper wasp *Polistes exclamans* Viereck (Hymenoptera: Vespidae), in a wind tunnel. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 1277-1287, 1990.
- REEVE, H. K. *Polistes* In: ROSS, K. G.; MATTHEWS, R. W. (Org.) **The social biology of wasps**. New York: Cornell University, 1991.
- RICHARDS, O. W. **The species of America, excluding the Vespinae**. London: British Museum, 1978.

- SHELLMAN, J. S.; GAMBOA, G. J. Nestmate discrimination in social wasps: the role of exposure to nest and nestmates (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 11, p. 51-53, 1982.
- SINZATO, D. M. S.; PREZOTO, F. Aspectos comportamentais de fêmeas dominantes e subordinadas de *Polistes versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae) em colônias na fase de fundação. **Revista de Etologia**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 121-127, 2000.
- SINZATO, D. M. S.; PREZOTO, F.; DEL-CLARO, K. The role of males in a neotropical paper wasp, *Polistes ferrerii* Saussure, 1853 (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). **Revista Brasileira de Zociências**, Juiz de Fora, v. 5, n. 1, p. 89-100, 2003.
- SOROKER, V.; HEFETZ, A. Hydrocarbon site of synthesis and circulation in the desert ant *Cataglyphis niger*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 46, p. 1097-1102, 2000.
- SOROKER, V.; LUCAS, C.; SIMON, T.; FRESNEAU, D.; DURAND, J. L.; HEFETZ, A. Hydrocarbon distribution and colony odour homogenisation in *Pachycondyla apicalis*. **Insectes Sociaux**, Basel, v. 50, p. 212-217, 2003.
- SOUZA, G. M. C. **Estudo da idade e das condições morfofisiológicas influenciando o peso corporal de fêmeas adultas de *Polistes versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 1998.
- SPRADBERRY, J. P. **Wasps - an account of the biology and natural history of solitary and social wasp**. Washington: University of Washington Press, 1973.
- STRAMBI, A. Physiology and reproduction in social wasps. In: ENGELS, W. (Org.) **Social Insects: An evolutionary approach to castes and reproduction**. New York: Springer-Verlag, 1990.
- SUZUKI, T. Production schedules of males and reproductive females, investment sex ratios, and worker-queen conflict in paper wasps. **Western North American Naturalist**, Provo, v. 128, p. 366-378, 1986.
- TURILLAZZI, S.; CERVO, R. Territorial behaviour in males of *Polistes nimpha* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). **Zeitschrift für Tierpsychologie**, Berlin, v. 58, p. 174-180, 1982.
- VALADÃO, R. **Dados sobre a interação prole-adulto em *Polistes versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia). UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1986.
- WENZEL, J. W. Male reproductive behavior and mandibular glands in *Polistes major* (Hymenoptera: Vespidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 34, n. 1, p. 44-57, 1987.

- WEST-EBERHARD, M. J. The social biology of the Polistinae wasps. **Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology**, Ann Arbor, v. 140, p. 1-101, 1969.
- ZARA, J. F.; BALESTIERI, J. B. P. Behavioural catalogue of *Polistes versicolor*. Post emergent colonies (Vespidae: Polistinae). **Naturalia**, São Paulo, v. 25, p. 301-319, 2000.

### **CAPÍTULO 3**

#### **Padrões histoquímicos da glândula ectomandibular de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae) e suas relações com idade, comportamento e casta.**

##### **Resumo**

Apesar de não serem muitos os estudos com as glândulas exócrinas em Vespidae, estes apresentam grande importância para compreensão da biologia destes insetos. Este trabalho analisou histoquimicamente a glândula ectomandibular de *Polistes versicolor*, de colônias em pós-emergência, e comparou os padrões encontrados com a idade e o comportamento. Esta glândula apresenta proteínas, lipídios e glicoconjugados neutros, em concentrações que variavam entre os indivíduos, de acordo com a fase do desenvolvimento da colônia. A variação dos compostos da secreção pode estar relacionada à densidade populacional no ninho, de adultas e/ou imaturos, porém não com a idade.

##### **Abstract**

The study of exocrine glands in Vespidae is still limited, but its importance has been demonstrated to understand the wasp biology. This work shows the results of histochemical analysis of *Polistes versicolor* ectal mandibular gland in post-emergent colonies, and compares the patterns found



with the individual's age and behavior. This gland presents proteins, lipids and neutral glycoconjugates and its concentrations varies according to the colony development. The secretion compounds variation may be related to the population density of adults and/or immature individuals in the nest, however not with the age.

## **Introdução**

*Polistes versicolor* é uma vespa difundida por toda América do Sul (MAULE-RODRIGUES, 1968; GOBBI, 1977; GOBBI e ZUCCHI, 1980), sendo uma espécie relativamente bem estudada, se comparada a outras vespas. Representante do gênero *Polistes*, que ocorre ao redor do mundo todo (RICHARDS, 1978), apresenta organização eussocial primitiva, caracterizada pela diferenciação de atividades e interações físicas, formando uma relação hierárquica linear, com uma das fêmeas tornando-se a dominante e as demais subordinadas (PARDI, 1948; GOBBI, 1977). Pela eussocialidade primitiva e distribuição cosmopolita, este é considerado um gênero chave para compreensão da evolução da socialidade (EVANS E WEST-EBERHARD, 1970).

Diferenças morfológicas externas, estatisticamente significantes, não foram encontradas entre as castas de *P. versicolor* (MAULE-RODRIGUES, 1968; GOBBI, 1977) ou de outras espécies de *Polistes* e *Mischocyttarus* (CUMBER, 1951). Assim acredita-se que a diferenciação entre as castas seja apenas comportamental. Contudo, internamente, algumas diferenças podem ser marcantes. Prova disto são os vários trabalhos que retratam a separação das castas de *P. versicolor* pelo caracter “grau de desenvolvimento ovariano” (GOBBI, 1977; CRUZ-LANDIM e SAENZ, 1972; NASCIMENTO e CRUZ-LANDIM, 1997; CARNEIRO SILVA, 1991). Além do ovário, outras estruturas internas podem apresentar variações, devido as diferenças fisiológicas de cada casta, expressas pelas diferentes tarefas realizadas por cada casta em uma colônia. Cruz-Landim e Saenz (1972), relataram pequenas diferenças das glândulas do sistema salivar de *P. versicolor*, entre as castas. Nascimento e

Cruz-Landim (1997) mostraram diferenças relacionadas à hierarquia social, no desenvolvimento das glândulas associadas ao aparelho de ferrão, também em *P. versicolor*, onde as fêmeas dominantes apresentaram tais glândulas significativamente maiores que das subordinadas. Futuras rainhas de *P. exclamans* se mostram com desenvolvimento surpreendentemente maior de seu corpo gorduroso, localizado no abdome, quando comparadas com suas irmãs operárias (EIKWORT, 1969).

Na formiga *Atta sexdens rubropilosa*, Nascimento *et al.* (1993), encontraram diferenças na concentração dos componentes que formam o produto da glândula mandibular, quando comparadas às diferentes castas de uma colônia. Em abelhas *Apis mellifera*, Costa-Leonardo (1980), encontrou variações morfológicas, histológicas e histoquímicas nas glândulas mandibulares entre as castas e de acordo com a idade do indivíduo, no caso das operárias. Posteriormente, Costa-Leonardo e Cruz-Landim (1985) também relatam a variação da glândula mandibular em *A. mellifera* rainhas, de acordo com o grau de atividade na colônia (franca postura, início ou final do período de postura).

Landolt e Akre (1979), estudando o sistema glandular em diferentes vespas, identificaram 14 glândulas, espalhadas pelo corpo destes animais. Ligadas à mandíbula, estes autores encontraram um par de glândulas, denominadas glândulas ectomandibulares, homólogas às glândulas mandibulares dos demais Hymenoptera.

A glândula ectomandibular de *P. versicolor* está alojada lateralmente na cavidade cefálica, entre a gena e os feixes musculares ligados à mandíbula, estendendo-se desde a base da mandíbula até a margem do olho. Esta glândula apresenta uma porção secretora composta por células individualizadas, com núcleos deslocados basalmente, podendo haver vários nucléolos. Cada célula secretora está ligada ao reservatório por meio de canaliculos quitinosos individuais. O reservatório é um saco membranoso, claviforme, cujas paredes são constituídas por células achatadas, com núcleos ricos em nucléolos (PIETROBON e CAETANO, 2001, 2003, 2004).

Segundo Fortunato (1996 *apud* FORTUNATO *et al.*, 2000) a glândula ectomandibular de *P. dominulus* produz aldeídos, álcoois e ácidos orgânicos, produtos voláteis típicos de alomônios. Fortunato *et al.* (2001) encontrou em glândulas ectomandibulares de *P. dominulus* 32 compostos, principalmente ácidos alifáticos variando de C<sub>2</sub> a C<sub>18</sub>, aldeídos de C<sub>7</sub> a C<sub>12</sub> e poucos álcoois.

A análise histoquímica da glândula ectomandibular de *P. versicolor*, mostrou que a secreção contém compostos lipídicos, protéicos e glicoconjugados neutros (PIETROBON e CAETANO, 2001), apresentando-se homogeneamente basófila (PIETROBON e CAETANO, 2003). Este estudo revelou ainda a clara variação na concentração destes compostos, quando comparadas às castas de uma colônia pós-emergente. Segundo os autores estas diferenças sugerem secreções diferentes, com funções possivelmente diferentes, entre as subcastas de subordinadas. Todavia apenas o inter-relacionamento de dados comportamentais, etários e histoquímicos poderá comprovar tal hipótese.

Assim, o presente trabalho visa analisar histoquimicamente a glândula ectomandibular de *Polistes versicolor*, de colônias em pós-emergência, e comparar os padrões observados com a idade e comportamento, buscando relações que possam levar a compreensão da função desta glândula em *P. versicolor*.

## **Materiais e Métodos**

### **Preparação da glândula para microscopia de luz**

Foram observadas quatro colônias de *Polistes versicolor*, onde todos os indivíduos foram marcados e cujos comportamentos e idades foram registrados diariamente.

Estes indivíduos foram coletados e anestesiados com gradual diminuição da temperatura até 4°C. Com auxílio de pinças e microtesoura, as glândulas ectomandibulares foram retiradas em placa de Petri preparada para dissecação, com solução fisiológica para insetos (NaCl 7,5g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38g/L

e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,72g/L), sob estereomicroscópio. Também se trabalhou com a cabeça inteira, abrindo-se pequenas aberturas nas laterais (gena e olhos) e retirando-se o clipeo para melhor penetração das soluções utilizadas para fixação e emblocamento.

Em seguida, o material foi fixado em paraformaldeído a 4%, por no mínimo 4 horas, posteriormente sendo colocado em tampão de fosfato de sódio por 24 horas, e desidratado por meio de sucessivos banhos de etanol 70% , 80% , 90% e (2x) 95%, de 30 minutos cada. Em seguida, foi imerso em solução de resina de embebição (Leica) com álcool 95% (1:1) durante 4 horas a temperatura ambiente, para só então ser colocado em resina de embebição pura por 24 horas, a aproximadamente 4°C, para perfeita infiltração da resina no material.

Feito isto, o material foi colocado em resina de inclusão (Leica) com polimerizador (Hardener), sendo uma parte de polimerizador para cada 15 partes de resina, e mantido em estufa a 37°C, por mais 24 horas, para completa polimerização da resina, caracterizando o emblocamento.

Os blocos com material, assim confeccionados, foram colados em suportes, para serem cortados no micrótomo Leica RM 2145, com espessura entre 2,0µm e 5,0µm. Os cortes foram montados sobre lâminas para microscopia de luz (Corning).

Seguiram-se, assim, as colorações e reações histoquímicas descritas a seguir.

### **Técnicas histoquímicas**

#### **Técnica de Sudan Black B para evidenciar lipídios.**

As lâminas contendo as secções do material foram imersas em um banho rápido de etanol 70%. Em seguida, mergulhadas em solução saturada de Sudan Black B em etanol 70%, por 45 minutos. Novamente realizou-se outro banho em etanol 70%, por 2 minutos, para diferenciação. As lâminas foram montadas em gelatina para evitar que a diafanização retirasse a marcação, de acordo com o descrito, mais a frente, em montagem das lâminas.

### **Técnica do Azul de Nilo para evidenciar lipídios.**

As lâminas foram coradas em solução de Azul de Nilo, por 5 minutos a 37°C. Passado o tempo foram lavadas em água corrente e mergulhadas em solução de ácido acético 1% por 1 minuto. Por fim, as lâminas foram secas e montadas em gelatina.

### **Técnica do Azul de Bromofenol para evidenciar proteínas básicas.**

Os cortes foram imersos com solução de Azul de Bromofenol, a temperatura ambiente, durante 2 horas. Em seguida foram submersos em solução aquosa de ácido acético 0,5%, por 5 minutos. Para diferenciação foi utilizada água destilada. As lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá, de acordo com o descrito, mais a frente, em montagem das lâminas.

### **Técnica de Ninhidrina Schiff para marcação de proteínas do grupo $\alpha$ -amino (proteínas ácidas) (PEARSE, 1960).**

Os cortes foram submetidos à uma solução aquosa de Ninhidrina a 0,5%, por 2 horas a 37° C. Após esta etapa, foram lavados em água corrente durante 5 minutos e em seguida submetidos ao reagente de Schiff por mais 25 minutos, a temperatura ambiente. Por fim foram lavados em água corrente por dez minutos. As lâminas já secas foram montadas em Bálsamo do Canadá.

### **Técnica de Xilidine Ponceau para marcação de proteínas totais (MELLO e VIDAL, 1980).**

Os cortes foram hidratados em água destilada, durante 1 minuto. Posteriormente foram corados com solução de Xylidine Ponceau (0,1 g de Xylidine Ponceau em 100 ml de ácido acético a 2% com pH 2,5) por 15 minutos, lavados em ácido acético a 2% por 30 minutos e novamente lavados em água destilada. As lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá.

**Técnica de PAS e Alcian Blue (coloração simultânea) para evidenciar glicoconjugados ácidos e neutros com grupamentos 1,2 glicol (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983).**

Os cortes foram hidratados e em seguida corados em solução de Azul de Alcian 1% em ácido acético, por 30 minutos e a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada, para depois serem coradas em ácido periódico a 1%, por 5 minutos a temperatura ambiente. Após nova lavagem em água destilada, foram colocadas no reagente de Schiff por 15 minutos, no escuro e também a temperatura ambiente. Uma última lavagem em água corrente, por 5 a 10 minutos, se fez necessário antes da montagem das lâminas em Bálsamo do Canadá.

**Técnica de Carmin Best para evidenciar glicogênio.**

As lâminas foram rapidamente lavadas em ácido acético a 1% e posteriormente em água destilada, para então serem coradas em solução de Carmin Best por 15 a 30 minutos. Após a coloração as lâminas foram secas e montadas em Bálsamo do Canadá.

**Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) variante para núcleo e ribonucleoproteínas.**

Primeiramente foi realizada a hidratação dos cortes por 10 a 30 minutos em água destilada. Em seguida corou-se com Azul de Toluidina, pH 4.0 por 20 minutos. Passado o tempo, lavou-se rapidamente as lâminas e deixou-se secar. Seguiu-se, então, a reação com solução aquosa de  $MgCl_2$  0,05M, por 7 minutos. Novamente, lavou-se em água destilada, deixando-se secar posteriormente e montando-se as lâminas em Bálsamo do Canadá.

**Azul de Toluidina para detecção de grupamentos ácidos e ácidos nucléicos.**

Os cortes foram lavados em água destilada e depois colocados em solução de Azul de Toluidina 1% (1g de Azul de Toluidina, 1g de Borato de sódio, 1ml de álcool absoluto e 100ml de água destilada) por 20 minutos.

Passado o tempo, as lâminas foram lavadas, para se retirar o excesso do corante, secas e montadas em Bálsamo do Canadá.

### **Técnica de Feulgen para evidenciar DNA.**

O material foi hidrolizado em solução de ácido clorídrico 5N, por 45 minutos. Passado o tempo foi lavado em água destilada por 5 minutos para então ser corado com reativo de Schiff por 1 hora, no escuro. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas e montadas em Bálsamo do Canadá.

### **Montagem das lâminas**

Para montagem em gelatina glicerizada, foi colocada uma gota da gelatina, previamente derretida em estufa a 60° C, sobre os cortes, cobrindo-os com a lamínula. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e mantidas em geladeira.

Para montagem com Bálsamo do Canadá, as lâminas foram diafanizadas com um banho em xilol de três minutos. Os cortes foram então cobertos com Bálsamo do Canadá sintético e lamínula, deixando-se em estufa, a 37°C, para completar a secagem. O processo de diafanização não foi realizado para todas as técnicas.

## **Resultados e Discussão**

As reações histoquímicas foram realizadas em 44 indivíduos de 4 ninhos distintos e mostraram uma relativa variação interindividual, principalmente quando comparados indivíduos de ninhos distintos. De modo geral, pode-se identificar os componentes básicos que constituem a glândula ectomandibular de *P. versicolor* e sua secreção, que se encontram expressos nas tabelas 1 e 2.

A análise geral revelou a presença de lipídios, proteínas, glicoconjugados neutros e ácidos nucléicos no citoplasma das células secretoras. Devido as reações homogêneas entre os indivíduos, variando de

fracas a moderadas, para proteínas (fig.1A, 1B, 1C), lipídios (fig.2A) e glicoconjugados neutros (fig.2E, 2F), acreditamos que se tratem de compostos estruturais destas células. Da mesma maneira, Caetano (1988) observou reações de baixa intensidade com proteínas e lipoproteínas estruturais que constituem os tecidos do trato digestório de formigas. Cruz-Landim (1968) também observou resultados sempre fracos para proteínas, mas nunca ausentes, o que acredita serem indicações de proteínas estruturais da célula e não a qualquer produto da secreção da glândula salivar de abelhas. Apenas quando a intensidade aumentava, a autora assumia que era mesmo a secreção presente. E por fim, mesmo células conhecidamente não secretoras apresentaram-se positivas para proteínas e glicoconjugados, como as células do ducto da glândula salivar do tórax de *Trigona recursa* e *Xylocopa frontalis*, evidenciando componentes estruturais (OLIVEIRA, 1995).

Cruz-Landim (1968) demonstrou variações na intensidade de reação do PAS, em glândulas salivares de abelhas e, da mesma forma que Oliveira (1995), observou células imaturas com maior concentração de glicogênio que as demais, por meio da técnica de PAS. Segundo Pearse (1960) não só o glicogênio, mas todo glicoconjugado neutro reage com o ácido periódico de Schiff (PAS). Esta técnica baseia-se na capacidade do ácido periódico de oxidar as ligações carbono-carbono das seqüências 1-2 glicol, dos hidratos de carbono, produzindo aldeídos, que serão revelados pela reação com o reagente de Schiff, produzindo um composto corado e insolúvel de cor vermelha (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Quando analisamos as reações de PAS na glândula ectomandibular de *P. versicolor* (fig.2E, 2F), praticamente não observamos variações na intensidade das reações para glicoconjugados, independente da idade ou casta. As variações ficam por conta apenas do número de vesículas de secreção presentes (fig.2F), o que será discutido adiante. Aplicando-se a técnica de Carmin Best, para evidenciar apenas glicogênio, não se observou resultado positivo nesta glândula (fig.2C). Caetano (1998) também não encontrou qualquer evidência da presença de glicogênio nas glândulas pós-faríngeas de *Dinoponera australis*, apesar de Zylberberg *et al.* (1974 *apud* CAETANO, 1998) descreverem a presença de glicogênio em



todos os gêneros de formigas estudados. Caetano (1998) atribui tal discordância ao fato de ter trabalhado com formigas de ambientes naturais, enquanto Zylberberg *et al.* (1974 *apud* CAETANO, 1998) trabalharam com formigas de ninhos artificiais, onde existe abundância de alimento. Da mesma forma trabalhamos apenas com vespas em ambiente natural, o que pode ter ocasionado o mesmo efeito. De qualquer maneira, o glicogênio foi detectado apenas nas fases jovens de muitas espécies de Hymenoptera coletados no ambiente, tendo sido considerado um composto comum em larvas e pupas, que se reduz nos adultos, não exercendo nenhuma função no processo secretor das glândulas em abelhas (CRUZ-LANDIM, 1968). Desta forma, pode-se inferir que o resultado positivo apresentado pelo PAS estaria evidenciando apenas os glicoconjugados estruturais e que as células secretoras da glândula ectomandibular de *P. versicolor* não armazenam glicogênio, ou pelo alto metabolismo e baixa disponibilidade de alimento em condições naturais ou por se utilizar de outra substância para armazenagem de energia.

Ambas hipóteses acima levantadas apresentam evidências de estarem ocorrendo, provavelmente concomitantemente. A primeira delas vem de dois ensaios realizados para evidenciar ácidos nucleicos, a reação com Azul de Toluidina e a Variante de CEC (concentração crítica de eletrólitos). O azul de Toluidina é um corante básico que forma ligações eletrostáticas com os radicais ácidos presentes no tecido, onde estruturas ácidas, como o RNA e o DNA, coram-se em azul (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). A variante de CEC também se utiliza do azul de Toluidina, pois este corante, quando em grande concentração de cátions, apresenta metacromasia, de acordo com a concentração e molaridade destes cátions inorgânicos. Baseado no fato do ponto crítico para o RNA ser sempre maior que do DNA, a variante de CEC propõe que o tratamento com  $Mg^{2+}$  provoca a diferenciação entre o DNA e o RNA. Enquanto o DNA fica corado de verde, o RNA se mantém metacromático, assim pode-se identificar DNA e RNA, além de eucromatina e heterocromatina, núcleos de diferentes espécies e núcleos em diferentes condições fisiológicas do desenvolvimento (MELLO e VIDAL, 1989; MONTEIRO, 1993; MELLO e FALCO, 1996).

Avaliar a concentração de RNA no citoplasma pode ser indicativo da presença de retículo endoplasmático rugoso, como sugerido por Rocha (2004), e/ou avaliar a atividade celular, como relatado por Cruz-Landim (1968). Desta forma, a grande concentração de RNA no citoplasma (fig.3A, 3B), pode ser indicativo de altas taxas de síntese. Quando analisado os resultados da técnica de Feulgen, para DNA, pode-se observar a presença de grandes núcleos, com um nucléolo bem desenvolvido ou, não raramente, mais de um, além de baixa quantidade de heterocromatina (fig.3C), novamente características de células em alta atividade de síntese (ALBERTS *et al.*, 2004). Assim, tudo leva a crer que estas células encontram-se em alta atividade, necessitando de grande demanda de energia, como sugerido.

A segunda hipótese, quanto a utilização de outra forma de reserva de energia, tem apoio nos dados de Caetano (1998) para *Dinoponera australis* e Pietrobon e Caetano (2004) para *P. versicolor*, que relataram a presença de mitocôndrias derivadas, que acumulam lipídio em seu interior, em células de glândulas salivares. Pode-se supor assim, que talvez tais mitocôndrias derivadas estejam envolvidas com o armazenamento de energia, na forma de lipídios, explicando por que não foi observado glicogênio nestas células. Mitocôndrias têm a capacidade de armazenar certas substâncias, funcionando como pequenos depósitos dentro da célula (ALBERTS *et al.*, 2004). Elas podem captar ácidos graxos do citoplasma e quebra-los em acetil-CoA para produção de energia, quando os carboidratos são escassos (LEHNINGER *et al.*, 1995). A glândula pós-faríngea apresenta pouco corpo gorduroso recobrando-a, em *Dinoponera australis* (CAETANO, 1998) e *Camponotus rufipes* (GAMA, 1985). Da mesma forma, a glândula ectomandibular de *P. versicolor*, em muitos casos, também apresenta uma capa de corpo gorduroso sobre suas células secretoras, que podem estar cedendo reservas para produção de energia para a glândula (fig.1B, 1C).

Os núcleos, tanto das células secretoras quanto das células do reservatório, apresentam-se negativos para lipídios (fig.2A) e glicoconjugados (fig.2E). Entretanto, estes mesmos núcleos, além de apresentarem reação positiva para ácidos nucléicos (fig.3A, 3B, 3C), também o apresentaram para

proteínas básicas (fig.2B). Tais resultados já eram esperados. A presença de proteínas em núcleos é bastante conhecida, uma vez que proteínas básicas, do grupo das histonas, responsáveis pelo empacotamento do DNA, apresentam-se em quantidade tão elevada que sua massa total dentro do núcleo chega a ser igual àquela do DNA (ALBERTS *et al.*, 2004).

No citoplasma das células secretoras podem ser observadas vesículas de secreção, em quantidades variáveis de acordo com o indivíduo (fig.1B, 1C, 1D, 1E, 2E, 2F), independentemente da casta ou idade. Tais diferenças podem estar relacionadas ao grau de desenvolvimento da glândula onde, segundo Fortunato *et al.* (2000), o ciclo secretor da glândula ectomandibular de *P. dominulus* varia de acordo com o desenvolvimento da colônia. Em *Apis mellifera* (COSTA e CRUZ-LANDIM, 1977; COSTA-LEONARDO, 1980) e nas formigas *Camponotus rufipes* (GAMA, 1985) e *Atta laevigata* (HERNANDÉZ e CAETANO, 1995), a glândula mandibular de rainha é mais desenvolvida do que nas operárias logo, apesar de *P. versicolor* e *P. dominulus* apresentarem pequenas diferenças morfológicas das glândulas ectomandibulares, entre as castas (CRUZ-LANDIM e SAENZ, 1972; FORTUNATO *et al.*, 2001 respectivamente), uma maior diferenciação pode estar havendo em nível celular.

As vesículas de secreção, presentes no citoplasma das células secretoras, reagiram positivamente para lipídios, proteínas e glicoconjugados neutros (fig.1A, 1B, 1C; 2A, 2E, 2F). A intensidade destas reações foi muito semelhante à observada na secreção armazenada no reservatório (fig.1A, 1B, 1C; 2A, 2E; tab.1, 2).

A reação com Sudan Black foi a utilizada para evidenciar lipídios, reação esta que se baseia no processo físico em que o corante em solução alcóolica é mais facilmente dissolvido em lipídios, corando-os. Há uma possibilidade de que algumas reações químicas ocorram entre um ou ambos os grupos amino deste corante e certos elementos dos tecidos. Mais recentemente tem-se assumido que a identificação dos lipídeos pelo Sudan Black seja por interações hidrofóbicas (VIDAL e MELLO, 1980).

**Tabela 1** Resultados das reações histoquímicas para glândula ectomandibular de *P. versicolor*, para lipídios e proteínas.

	Sudan Black B	Azul de Nilo	Xilidine Ponceau	Azul de Bromofenol	Ninhidrina Schiff
Núcleo	–	+	+	+	–
Nucléolo	–	+	+++	+++	++
Citoplasma	+	+	++	++	+
Vesículas	+	–	+++	+++	++
Secreção	++	–	+++	++	+
	Lipídios	Lipídios	Proteínas totais	Proteínas básicas	Proteínas ácidas

Leg.: - resultado negativo; + fracamente positivo; ++ medianamente positivo; +++ fortemente positivo

**Tabela 2** Resultados das reações histoquímicas para glândula ectomandibular de *P. versicolor*, para glicoconjugados, ácidos nucleicos e glicogênio.

	PAS	Azul de Alcian	Feulgen	Variante de CEC	Azul de Toluidina	Carmim best
Núcleo	–	–	+	+	+	–
Nucléolo	–	–	–	+++	+++	–
Citoplasma	+	–	–	++	++	–
Vesículas	++	–	–	–	–	–
Secreção	+++	–	–	–	–	–
	Glicoconjugados neutros	Glicoconjugados ácidos	DNA	Núcleo/ribonucleoproteínas	Ácidos nucleicos	Glicogênio

Leg.: - resultado negativo; + fracamente positivo; ++ medianamente positivo; +++ fortemente positivo

Para proteínas foram utilizadas as técnicas de Xilidine Ponceau, Ninhidrina Schiff e Azul de Bromofenol. O Xilidine é um corante ácido azóico sulfatado escarlate, que marca proteínas totais (MELO e VIDAL, 1980). A Ninhidrina reage com os grupos  $\text{NH}_2$  livres dos  $\alpha$ -aminoácidos, resultando num composto róseo. Esta reação, que evidencia as proteínas ácidas, não é estável e o composto formado pode se difundir no tecido (PEARSE, 1960). Já o azul de bromofenol é um indicador de íons hidrogênio da classe sulfataleína, reagindo com proteínas básicas e proteínas com aminoácidos contendo grupamentos Tiol (SH), pela dissociação do grupo hidroxil (PEARSE, 1960). Por fim, a técnica de PAS foi aplicada para evidenciar glicoconjugados neutros, cujas

reações durante a marcação já foram discutidas anteriormente, na discussão sobre marcação de glicogênio.

Fortunato *et al.* (2001) identificou como secreção da glândula ectomandibular de *P. dominulus* apenas uma série de ácidos alifáticos, aldeídos e álcoois, entretanto a extração da secreção se deu em água destilada, coletando-se apenas o material que flutuava. Acreditamos que apenas uma fração da secreção tenha sido coletada desta maneira, explicando a não concordância dos resultados dos testes histoquímicos aqui apresentados, que demonstram a presença de lipídios, proteínas, glicoconjugados e/ou formas conjugadas destes compostos, com os dados de análise química em *P. dominulus*.

Apesar de sabermos que a secreção da glândula ectomandibular de *P. versicolor* é formada por um complexo de compostos, pouco podemos inferir quanto suas funções. Apenas a presença da porção lipídica na secreção (fig.2A) pode ser interpretada como precursor de feromônios (TILLMAN *et al.*, 1999), apoiando a idéia de Downing e Jeanne (1982) que sugerem ser esta uma glândula produtora de sinais químicos para comunicação, apesar de haverem hipóteses mais recentes para função desta glândula em *Polistes* (FORTUNATO *et al.*, 2001).

Por fim, a marcante variação interindividual observada, poderia estar relacionada com fases distintas do ciclo secretor ou diferenças entre castas. Segundo Cruz-Landim (1968) há variações nas concentrações de proteínas, glicoconjugados e lipídios, durante o desenvolvimento das glândulas de insetos. Zara e Caetano (2002) sugerem que variações morfológicas de algumas organelas, das células secretoras da glândula salivar de larvas de *Pachycondyla (Neoponera) villosa*, poderiam estar relacionadas a estágios fisiológicos diferentes da própria célula. Segundo Costa-Leonardo (1981) também ocorre um ciclo secretor na glândula mandibular de operárias de *Apis mellifera*, resultando nas variações notadas entre os indivíduos de diferentes idades. Este ciclo secretor foi observado por Fortunato *et al.* (2000) em *P. dominulus*, onde a glândula variava de acordo com o desenvolvimento da colônia e conseqüentemente com a idade das vespas. Em *P. versicolor*,

Pietrobon e Caetano (2004) também observaram variações celulares ao longo do ciclo secretor, que possivelmente se reflete em variação ou mesmo mudança dos compostos sintetizados por esta glândula. Tais variações serão melhor discutidas adiante.

As técnicas de Azul de Alcian (fig.2E) e Azul de Nilo (fig.2B) apresentaram resultados negativos e duvidosos, respectivamente. Segundo Pearse (1960), ao menos para o Azul de Alcian, a especificidade da marcação é dependente do tempo de exposição. Os polissacarídeos fortemente sulfatados reagem com o Azul de Alcian a pH 1.0, os fracamente sulfatados reagem entre pH 1.0 e 2.5, e polissacarídeos ácidos não sulfatados (apenas carboxilados) reagem entre pH 1.7 e 3.2 (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Assim, tanto o tempo, quanto o pH são importantes variáveis, onde qualquer desvio poderia causar um desajuste da técnica. Entretanto, glicoconjugados ácidos não são citados em trabalhos com glândulas de insetos (CRUZ-LANDIM, 1968; PIETROBON, 2001; ROCHA, 2004), o que corrobora para hipótese de ausência destes compostos na glândula ectomandibular de *P. versicolor*. Já o Azul de Nilo, utilizado para evidenciar lipídios, apresentou resultados contraditórios, quando comparados aos resultados do Sudan Black B (fig.2A, 2B; tab.1), outro teste para lipídios. Zara (1998) ao comparar os testes histoquímicos de Azul de Nilo, fortemente positivos para o citoplasma da glândula salivar larval de *N. villosa*, com análises ultra-estruturais das mesmas células, onde poucas gotas lipídicas puderam ser observadas, colocou em dúvida a especificidade do teste de Azul de Nilo. Em contrapartida, os resultados do Sudan Black foram negativos, concordando com a análise ultra-estrutural (ZARA, 1998). Tal resultado também está de acordo com o pensamento de Macha (Com. Pes.) sobre a inespecificidade do azul de Nilo para lipídeos. Assim, acreditamos que as reações do Azul de Nilo se tratem de marcações inespecíficas, tendo sido desconsiderado para esta análise.

### **Comparação entre padrões histoquímicos, idades e comportamentos.**

A análise do padrão histoquímico, a ser apresentado, levou em consideração apenas as reações com a secreção contida no reservatório ou

nas vesículas presentes no citoplasma da célula secretora, cujos resultados eram coincidentes. Analisando mais atentamente as diferenças interindividuais encontradas, pôde-se verificar que os principais componentes variáveis foram as proteínas básicas e lipídios, estando os demais elementos sempre presentes, variando apenas quanto a intensidade da reação.

Para melhor visualização dos resultados, os dados foram organizados em tabelas correspondentes a cada ninho estudado, sendo discutidos adiante.

Os indivíduos do ninho ME1 apresentam variações quanto a presença de lipídios e proteínas constituintes da secreção (tab.3). Alguns apresentam proteínas ácidas e básicas, porém há aqueles que apresentam apenas proteínas ácidas. Com exceção da dominante (indivíduos I), a concentração de glicoconjugados basicamente coincidiu com a intensidade de marcação das proteínas básicas, o que poderia ser um indício da presença de uma glicoproteína.

**Tabela 3** Padrões histoquímicos da secreção da glândula ectomandibular, grupo comportamental (de acordo com o cladograma e PCA) e idade dos indivíduos do ninho ME1.

Indivíduo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Idade (dias)	56	23	23	18	17	15	8	8	8	6
Cladograma	A	B	B	B	B	C	C	C	C	C
PCA	A	C	C	C	C	C	C	B	C	C
Lipídios	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Proteínas básicas	-	-	+++	-	+++	+++	+	-	-	-
Proteínas ácidas	-	++	+++	++	++	++	+	+	++	++
Glicoconjugados	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++

Leg.: - resultado negativo; + fracamente positivo; ++ medianamente positivo; +++ fortemente positivo; A, B, C grupos ao qual pertencem, expressos nas figuras 2 e 3 do capítulo 1 desta tese.

**Tabela 4** Padrões histoquímicos da secreção da glândula ectomandibular, grupo comportamental (de acordo com o cladograma e PCA) e idade dos indivíduos do ninho ME4.

Indiv.	I	II	III	IV	V	VI
Idade (dias)	46	46	28	27	26	4
Cladograma	A	D	C	C	C	D
PCA	A	C	E	E	D	B
Lipídios	+++	+++	++	+++	+++	+++
Proteínas básicas	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Proteínas ácidas	++	+++	++	++	+++	+++
Glicoconjugados	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Leg.: - resultado negativo; + fracamente positivo; ++ medianamente positivo; +++ fortemente positivo; A, B, C grupos ao qual pertencem, expressos nas figuras 6 e 7 do capítulo 1 desta tese.

As diferenças observadas entre os indivíduos não se encontram relacionadas aos grupos comportamentais formados pelas análises multivariadas ou mesmo quando analisamos a tabela de comportamentos, não se pode distinguir um comportamento ou grupo de comportamentos específicos cuja maior frequência de realização coincida com os indivíduos com padrão diferenciado, sugerindo não haver relação. Há apenas uma tendência dos indivíduos mais jovens a apresentarem ausência de marcação para lipídios em sua secreção, porém não podendo ser considerada regra, uma vez que, como pode ser observado na tabela 3, o indivíduo mais jovem coletado (6 dias) apresentou marcação positiva para lipídios.

A colônia ME1 encontrava-se em início de pós-emergência, com poucos indivíduos adultos e imaturos na colônia. A hierarquia, provavelmente, havia se estabelecido a pouco tempo.

Já os indivíduos do ninho ME4 constituem um grupo bastante homogêneo (tab.4), uma vez que não se observam variações interindividuais, quanto aos constituintes da secreção e poucas variações quanto a concentração destes compostos.



**Tabela 5** Padrões histoquímicos da secreção da GEM, grupo comportamental (de acordo com o cladograma e PCA) e idade dos indivíduos do ninho ME5.

Indivíduo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Idade (dias)	34	28	28	26	23	20	7	1	1
Cladograma	B	B	A	C	C	C	C	A	A
PCA	B	B	A	D	D	C	C	B	B
Lipídios	++	+++	+++	+	++	φ	+++	+++	+++
Proteínas básicas	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Proteínas ácidas	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Glicoconjugados	+++	φ	++	+++	++	++	++	++	+++

Leg.: - resultado negativo; + fracamente positivo; ++ medianamente positivo; +++ fortemente positivo; φ sem dados; A, B, C grupos ao qual pertencem, expressos nas figuras 10 e 11 do capítulo 1.

Todos os indivíduos testados do ninho ME4 apresentam lipídios e proteínas básicas, que se encontravam ausentes em alguns indivíduos do ninho ME1. Porém, apesar de possuímos uma amostra bastante diversificada quanto às idades e comportamentos, não contamos com todos os indivíduos do ninho, pois foram excluídos aqueles cuja idade não havia sido determinada com certeza. Assim, poderia haver ainda indivíduos do padrão sem lipídios e proteínas básicas, mas que de qualquer forma constituiriam a minoria deles.

Esta colônia encontrava-se já há algum tempo em pós-emergência, sendo composta por vários indivíduos adultos e jovens. Apresentavam relações hierárquicas bastante estáveis.

O padrão histoquímico da glândula ectomandibular dos indivíduos do ninho ME5 é, também, mais constante, sem variações dos constituintes e poucas na concentração destes (tab.5). Esta colônia já se encontrava em início de declínio ou final de ciclo, entretanto o padrão histoquímico da secreção da GEM de seus membros encontra-se idêntica a do ninho ME4, em pós-emergência. Por encontrar-se no início do final de ciclo, apresentava um número relativamente baixo de indivíduos, mas que se encontravam em desorganização hierárquica, com substituição da dominante e um alto índice de

canibalismo das formas imaturas, que reduziam o já pequeno número de larvas e pupas.

Por fim, o ninho ME3, tipicamente em final de ciclo, volta a apresentar o padrão do primeiro ninho, o ME1, com alguns indivíduos possuindo secreções sem lipídios e proteínas básicas em sua constituição (tab.6). Novamente tais variações ocorrem independentemente da idade, grupo comportamental ou comportamento específico. A colônia possuía grande número de indivíduos, apresentando certa desorganização hierárquica e baixíssimo número de formas imaturas.

Variações quanto ao padrão histoquímico entre os indivíduos já eram esperadas. Pietrobon e Caetano (2001) já haviam relatado variações na presença de lipídios e proteínas entre os indivíduos de determinada colônia de *P. versicolor*, atribuindo tal variação a subcastas de subordinadas, que possivelmente desempenhariam funções diferenciadas na colônia, fato não confirmado aqui. Fortunato *et al.* (2001) demonstraram, por meio da análise cromatográfica da secreção, que há variações interindividuais quanto a concentração dos componentes constituintes da secreção da GEM, devido, segundo estes autores, a diferenças entre estágios do ciclo secretor. Assim, as principais diferenças encontradas ocorrem entre os indivíduos de colônias diferentes. Fortunato *et al.* (2000) também encontraram variações ultra-estruturais nas células secretoras, de acordo com a fase do ciclo da colônia. Estes autores acreditam que tais variações estejam relacionadas à alguma função da GEM na defesa da colônia, uma vez que se encontra mais desenvolvida nos períodos de maior vulnerabilidade da colônia. Como colônias em diferentes estágios foram observadas durante um mesmo período e sob as mesmas condições, está descartada a hipótese da variação estar relacionada a fatores climáticos e de disponibilidade de alimento.

**Tabela 6** Padrões histoquímicos da secreção da GEM, grupo comportamental (de acordo com o cladograma e PCA) e idade dos indivíduos do ninho ME1.

Indivíduos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII
Idade (dias)	92	30	30	30	24	24	24	20	15	15	10	10	5	0	0	0	0
Cladograma	A	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	B	C	C	C	C	C
PCA	A	C	C	B	C	C	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Lipídios	+++	++	+++	-	-	+	+	++	φ	-	-	+	++	-	-	-	-
Proteína básica	++	+++	φ	++	+++	++	+++	++	+	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+
Proteína ácida	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++	+++
Glicoconjugado	+++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Leg.: - resultado negativo; + fracamente positivo; ++ medianamente positivo; +++ fortemente positivo; φ sem dados; A, B, C grupos ao qual pertencem, expressos nas figuras 8 e 9 do capítulo 1 desta tese.

Desta forma, pode-se supor que há algum mecanismo intracolônial responsável por tal variação durante o desenvolvimento do ciclo colonial. A única variável coincidente com as diferenças histoquímicas é o número de indivíduos imaturos ou a relação adultos/imaturos de cada colônia.

Pimentel (1990), estudando o efeito da cria sobre o desenvolvimento da *corpora allata* e os ovários de *A. mellifera*, notou que o desenvolvimento destes órgãos, em indivíduos recém emergidos, em situações como ausência ou presença de rainha, pupas e larvas, mostraram diferenças significativas para todas as condições. Tais observações evidenciam a significativa influência da cria e da rainha na determinação das castas, uma vez que a *corpora allata*, responsável pela síntese do hormônio juvenil (NABERT, 1913), está envolvida em várias funções, inclusive a determinação das castas (SHUEL e DIXON, 1960; REMBOLD, 1987; BEETSMA, 1979), assim como os ovários em vespas (PARDI, 1948; WEST-EBERHARD, 1969; GOBBI, 1977).

Este é um dado bastante significativo uma vez que provavelmente haja uma regulação hormonal para alterações do ciclo secretor da GEM, como sugerido por Pietrobon e Caetano (2004). Estes autores descreveram fases do ciclo secretor da GEM de *P. versicolor*, sob o ponto de vista ultra-estrutural, onde observaram alterações entre as organelas cujo produto esperado de sua síntese coincide com o padrão histoquímico aqui descrito.

A glândula ectomandibular apresenta células em diferentes fases do ciclo secretor, onde a relação entre o número de células em cada fase deve ditar as características histoquímicas da secreção produzida. A diferença observada entre as células secretoras de uma mesma glândula pode ser devido ao efeito da regulação hormonal, havendo assincronismo na ativação dos receptores de membrana para este hormônio (PIETROBON e CAETANO, 2004). Da mesma forma, a glândula mandibular de *A. mellifera* também se apresenta assincrônica e provavelmente regulada por hormônios (COSTA-LEONARDO, 1981).

O ciclo secretor da GEM de *P. versicolor*, segundo Pietrobon e Caetano (2004), inicia-se com células apresentando características de alta atividade de síntese, rica apenas em retículo endoplasmático rugoso, o que sugere a

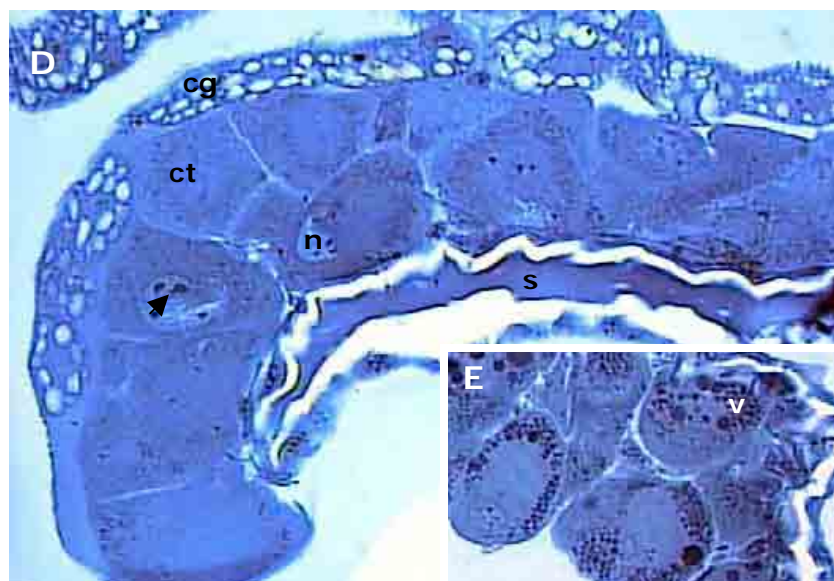
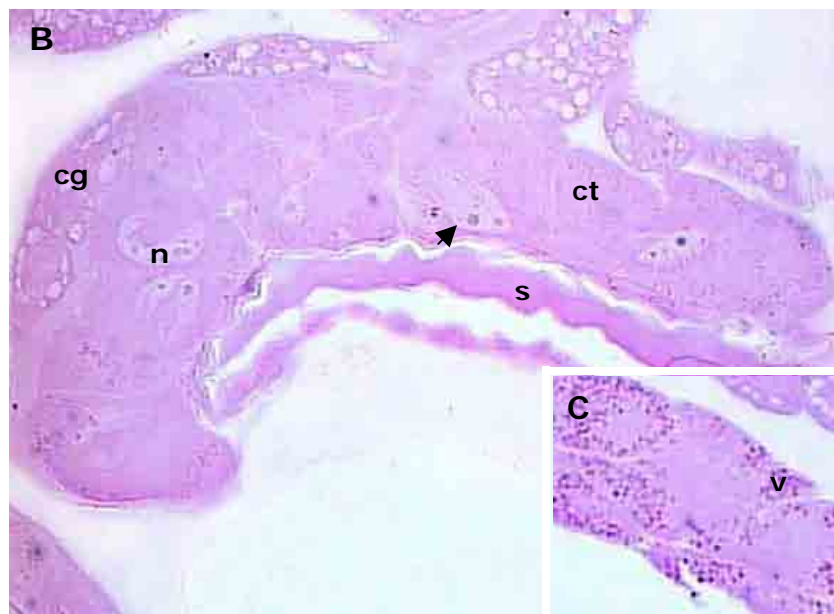
produção de proteínas, porém, poucas vesículas de secreção podem ser encontradas no citoplasma. No início do desenvolvimento colonial há indivíduos com ausência de lipídios na constituição da secreção, provavelmente por apresentarem as células secretoras no estágio de síntese de proteínas. Mais adiante, no desenvolvimento da glândula, observa-se que o retículo endoplasmático rugoso começa a mudar para retículo endoplasmático liso, há grande quantidade de ribossomos livres e as mitocôndrias e os complexos de Golgi mudam para formas mais globulares. Algumas vesículas de secreção se acumulam no citoplasma. Estas vesículas começam a passar de pequenas, com um centro eletrondenso para grandes, homogêneas e com menor eletrondensidade (PIETROBON e CAETANO, 2004). É, provavelmente, quando algumas das células secretoras encontram-se nesta fase, que podemos identificar a presença de lipídios e proteínas básicas na secreção. Provavelmente este seja o estágio mais ativo da glândula, pelo acúmulo de vesículas de secreção e pela maioria dos indivíduos apresentarem a secreção constituída por compostos sintetizados por células com tal organização. No final do ciclo, o citoplasma da célula secretora se torna mais vacuolizado, com corpos mielínicos, culminando na morte da célula, completamente vacuolizada (PIETROBON e CAETANO, 2004). Este fato concorda com o observado em indivíduos velhos, como o número I do ninho ME1, que se apresentava com estas características e com marcação positiva apenas para lipídios em sua secreção. Possivelmente a célula secretora nestas condições não apresenta mais condições de síntese e a presença de lipídios na secreção vem novamente concordar com Pietrobon e Caetano (2004), que demonstram características de secreção ou ao menos transporte de lipídios da hemolinfa para a luz do reservatório, pelas células da parede do reservatório.

Assim conclui-se que fatores como a estrutura populacional de adultos e/ou imaturos apresenta papel significativo na diferenciação histoquímica da secreção da GEM de *P. versicolor*, entre os indivíduos subordinados, visto ser esta a única variável entre as colônias analisadas. Todavia sua função ainda permanece incerta, podendo apenas descartar a hipótese da participação nas relações intercastas, como proposta por Downing (1990) e Edwards (1980),

pois as diferenças não são entre indivíduos de idades, casta ou grupo funcional diferentes. Distintamente da glândula salivar do tórax de *P. versicolor*, estudada por Rocha (2004), as células da GEM apresentaram sinais de morte celular, o que também descartaria a possibilidade de estar relacionada a funções vitais na colônia, as quais seriam desempenhadas por toda vida do animal. Mais recentemente, Fortunato *et al.* (2000, 2001) também excluem o papel na regulação social, sugerindo uma função de defesa contra vertebrados pelo cheiro forte que a secreção da GEM de *P. dominulus* possui. Porém, pelo fato da metodologia empregada não se apresentar adequada e não haver embasamento convincente para tal função, por meio de bioensaios, a princípio não consideramos tal papel como única função, cabendo aqui futuros estudos para testar a resposta das vespas à secreção produzida e, em especial, a relação da secreção desta glândula para com as larvas e pupas.

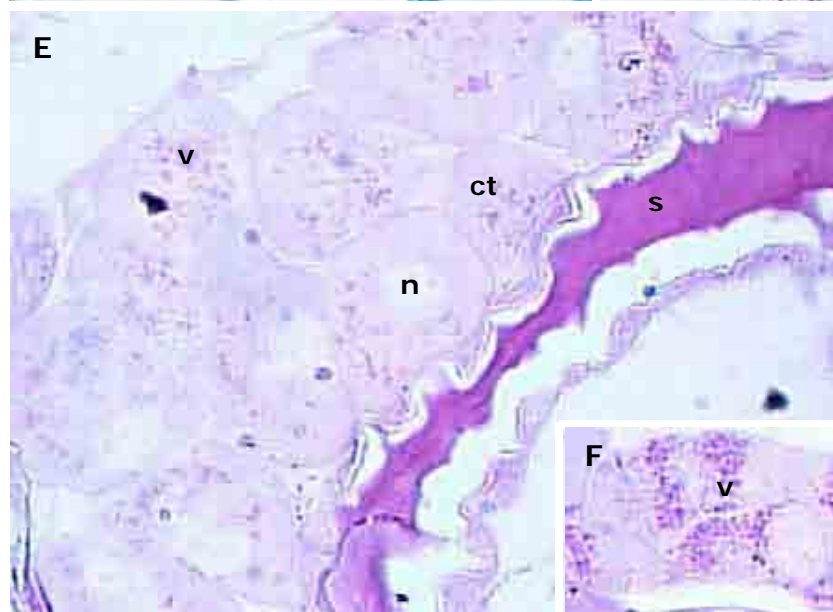
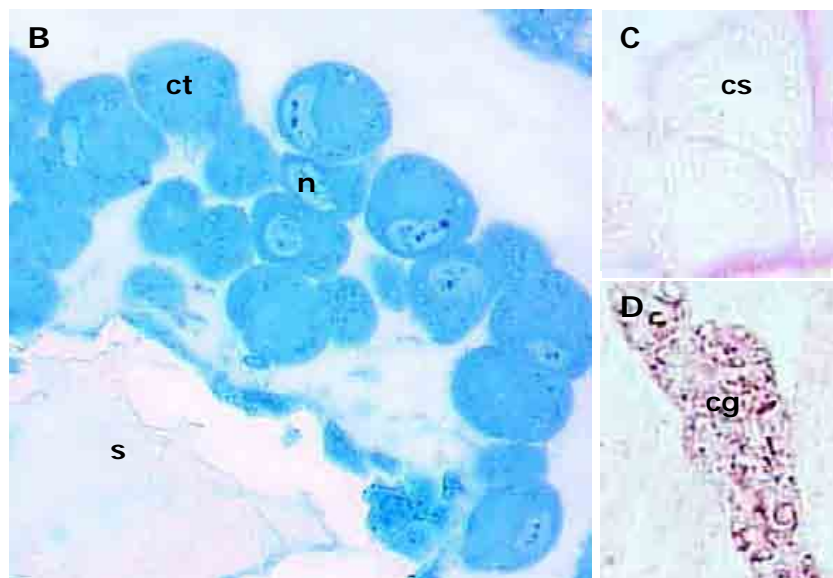
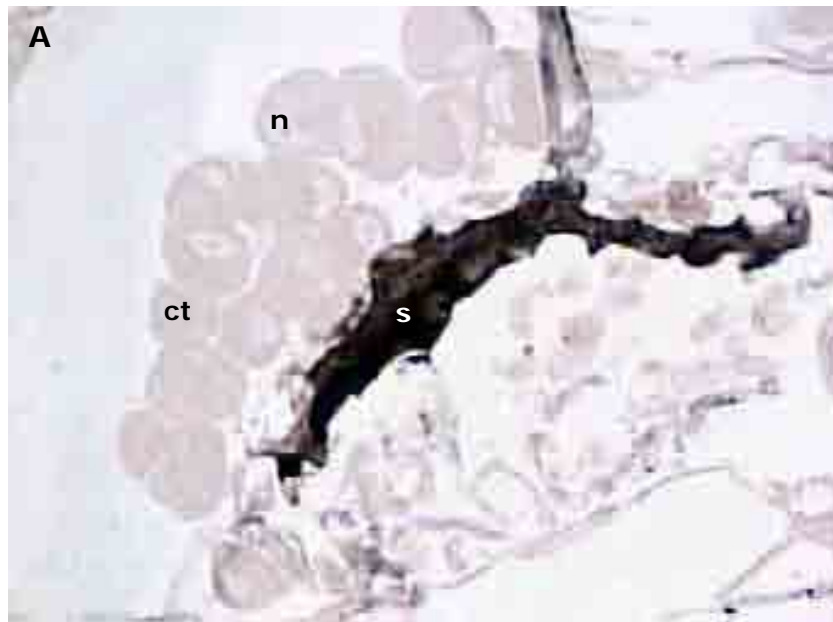
## Documentação Fotográfica

**Figura 1** Reações histoquímicas da glândula ectomandibular de *P. versicolor*, evidenciando proteínas. (A) técnica de Xilidine Ponceau, para proteínas totais, evidenciando o núcleo (n) positivo, o citoplasma (ct) medianamente positivo e os nucléolos (setas), as vesículas de secreção (v) e a secreção armazenada no reservatório (s) fortemente positivas; (B) técnica de Ninhidrina Schiff, para proteínas do grupo  $\alpha$ -amino (ácidas). Note a presença de corpo gorduroso (cg) recobrimo a glândula; (C) detalhe de células secretoras com grande quantidade de vesículas de secreção positivamente marcadas para proteínas ácidas; (D) técnica de Azul de Bromofenol, marcando proteínas básicas e; (E) detalhe mostrando as vesículas de secreção marcadas pela mesma técnica (aumentos 400x).

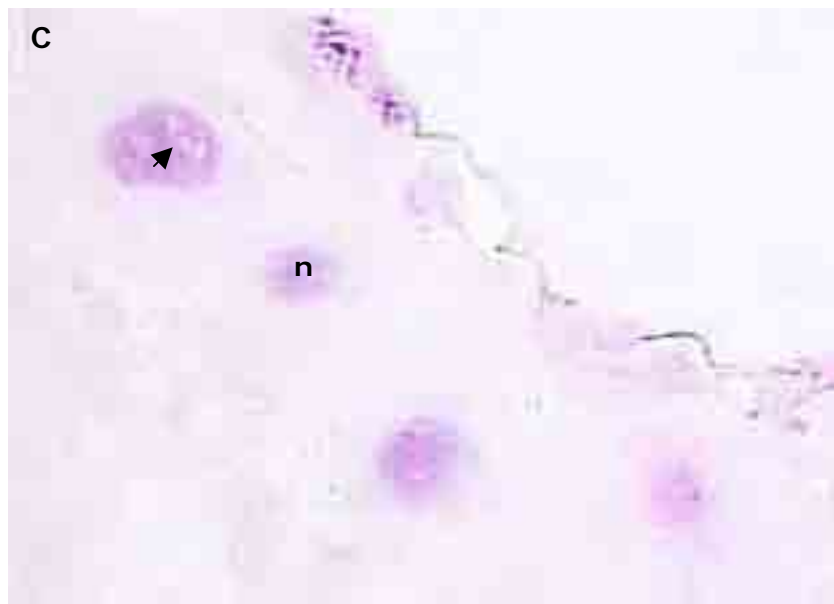
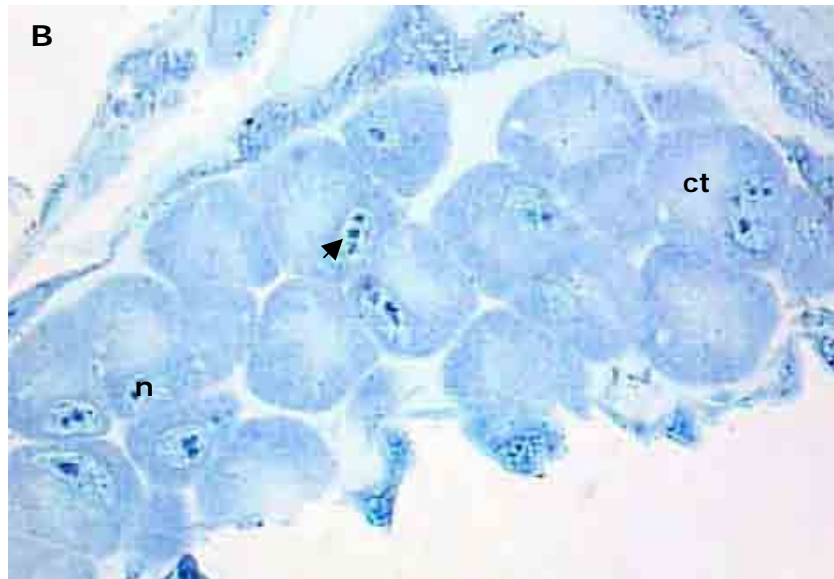




**Figura 2** Reações histoquímicas da glândula ectomandibular de *P. versicolor*. (A) técnica de Sudan Black B, para marcação de lipídios, evidenciando o núcleo (n) negativo, o citoplasma (ct) medianamente positivo e a secreção armazenada no reservatório (s) fortemente positiva; (B) técnica de Azul de Nilo, também para lipídios; (C) célula secretora (cs) em detalhe mostrando o resultado negativo para glicogênio, pela técnica de Carmim Best; (D) corpo gorduroso (cg) com reação positiva para glicogênio, servindo como controle positivo da técnica de Carmim Best; (E) técnica conjugada de PAS e Azul de Alcian, marcando apenas os glicoconjugados neutros e; (F) detalhe mostrando as vesículas de secreção positivamente marcadas para glicoconjugados neutros. (aumentos A, B, E, F = 400x; C = 500x; D = 200x)



**Figura 3** Reações histoquímicas da glândula ectomandibular de *P. versicolor* para ácidos nucleicos. (A) técnica variante CEC, diferenciando DNA em verde e RNA em roxo, evidenciando o núcleo (n), nucléolo (seta) e o citoplasma (ct) com maior concentração de RNA e ribonucleoproteínas na região mais periférica da célula secretora; (B) glândula corada com Azul de Toluidina, para detecção de grupamentos ácidos, apresentando basicamente os mesmos resultados do CEC; (C) técnica de Feulgen, específica para DNA, marcando os núcleos e apresentando os nucléolos (seta), geralmente mais que um, negativamente marcados. (aumentos 400x)



## Bibliografias

- ALBERTS B.; BRAY D.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WATSON J. D. **Biologia molecular da célula**. 4<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. **Bee World**, Bucks, v. 50, n. 1, p. 24-39, 1979.
- CAETANO, F. H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). **Naturalia**, São Paulo, v. 13, p. 129-174, 1988.
- CAETANO, F.H. **Aspectos ultramorfológicos, ultra-estruturais e enzimológicos da glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae)**. Tese (Livre-docência em Histologia), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1998.
- CARNEIRO SILVA, A. **Determinação do sistema de substituição de fêmeas dominantes em colônias de *Polistes* (Vespidae - Polistinae)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1991.
- COSTA, A. M.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar dos Apidae sociais (Hymenoptera). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 649-663, 1977.
- COSTA-LEONARDO, A. M. Estudos morfológicos do ciclo secretor das glândulas mandibulares de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 143-151, 1980.
- COSTA-LEONARDO, A. M. Ultra-estrutura do ciclo secretor das glândulas mandibulares de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 307-316, 1981.
- COSTA-LEONARDO, A. M.; CRUZ-LANDIM, C. Ciclo de desenvolvimento das glândulas mandibulares de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). I. Influência da idade, tamanho da colônia e temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 205-215, 1985.
- CRUZ-LANDIM, C. Histoquímica e ultra-estrutura das glândulas salivares das abelhas (Hymenoptera, Apoidea). **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v. 17, p. 113-166, 1968.
- CRUZ-LANDIM, C.; SAENZ, M. H. P. Estudo comparativo de algumas glândulas dos Vespoidea (Hymenoptera). **Papeis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 25, p. 251-263, 1972.
- CUMBER, R. A. Some observations on the biology of the Australian wasp *Polistes humilis* Fabr. (Hymenoptera: Vespidae) in North Auckland (New Zeland), with special reference to the nature of the worker cast.

- Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, London. v. 26, p. 11-16, 1951.
- DOWNING, H. A. The Function and Evolution of Exocrine Glands In: ROSS, K.G.; MATTHEWS, R.W. (Org.) **The Social Biology of Wasps**. New York: Cornell University Press, p. 540-569, 1991.
- DOWNING, H. A.; JEANNE, R. L. A description of the ectal mandibular gland in the paper wasp *Polistes fuscatus* (Hymenoptera, Vespidae). **Psyche**, Cambridge, v. 89, p. 317-320, 1982.
- EDWARDS, R. **Social wasps - their biology and control**. East Grinstead: Rentokil Limited, 1980.
- EIKWORT, K. Separation of the castes of *Polistes exclamans* and notes on its biology (Hym. Vespidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 15, p. 67-72, 1969.
- EVANS, H. E.; WEST-EBERHARD, M. J. **The Wasps**. An Arbor: University of Michigan Press, 1970.
- FORTUNATO, A.; TURILLAZZI, S.; DELFINO, G. Ectal mandibular gland in *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae): ultrastructural modifications over the secretory cycle. **Journal of Morphology**, Michigan, v. 244, p. 45-55, 2000.
- FORTUNATO, A.; MAILE, R. TURILLAZZI, S.; MORGAN, E.D.; MONETI, G.; JONES, G. R.; PIERACCINI, G. Defensive role of secretion of ectal mandibular glands of *Polistes dominulus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n. 3, p. 569-579, 2001.
- GAMA, V. O sistema salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 317-359, 1985.
- GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor***. Tese (Doutorado em Genética), USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1977.
- GOBBI, N.; ZUCCHI, R. On the ecology of *Polistes versicolor versicolor* (Olivier) in southern Brazil. (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). I – Phenological account. **Naturalia**, São Paulo, v. 5, p. 97-104, 1980.
- HERNANDÉZ, J. V.; CAETANO, F. H. Characterization of the mandible and mandibular glands in different castes of the leaf-cutting and *Atta laevigata* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae) using scanning electron microscopy. **Boletim Entomológico Venezuelano**, v. 10, n. 1, p. 51-56, 1995.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Santos, 1983.

- LANDOLT, P. J.; AKRE, R. D. Occurrence and Location of Exocrine Glands in Some Social Vespidae (Hymenoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 72, n. 1, p. 141-148, 1979.
- LEHNINGER A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2<sup>o</sup> edição, São Paulo: Sarvier, 1995.
- MAULE-RODRIGUES, V. **Estudo sobre vespas sociais do Brasil (Hymenoptera, Vespidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Rio Claro, 1968.
- MELLO, M. L. S.; FALCO, J. R. P. Critical electrolyte concentration of DNA-protein complexes in somatic cell nuclei of the honey bee. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 26, p. 793-795, 1996.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. **Práticas de biologia celular**. Campinas: Edgar Blucher, 1980.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, Cambridge, v. 59, p. 87-93, 1989.
- MONTEIRO, A. L. P. **Concentração crítica de eletrócitos em cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae)**. Dissertação (Mestrado), UNICAMP, Instituto de Biologia, Campinas, 1993.
- NABERT, A. Die Corpora Allta der Insekten. **Zeitschrift fur Wissenschaftliche Abteilung A (Zoologie)**, Leipzig, v. 104. p. 181-358, 1913.
- NASCIMENTO, F. S.; CRUZ-LANDIM, C. Correlação da hierarquia social de dominância com o desenvolvimento das glândulas associadas ao aparelho de ferrão de *Polistes versicolor* (Oliver, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 4, p. 709-718, 1997.
- NASCIMENTO, R. R.; MORGAN, E. D.; BILLEN, J.; SCHOETERS, E.; DELLA LUCIA, T. M. C.; BENTO, J. M. Variation with caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 5, p. 907-918, 1993.
- OLIVEIRA, G. M. C. **Histoquímica e ultra-estrutura das glândulas salivares de algumas espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea)**. Tese (Doutorado), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1995.
- PARDI, L. Ricerche sui Polistini. XI Sulla durata della permanenza delle femmine nel nido e Sull'accrescimento della societa in *Polistes gallicus* L. **Atti. Soc. Tosc. Sci. Nat.**, Pisa, v. 55, p. 3-15, 1948.
- PEARSE, A. G. E. **Histoquímica: teorica y aplicada**. Madrid: Aguilar, 1960.
- PIETROBON, T. A. O.; CAETANO, F. H. Histochemistry of the ectal mandibular gland of *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). A study for different

- castes in post-emerged colonies. **Acta Microscópica** (suplem.), Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Micro-análise, Águas de Lindóia, 2001.
- PIETROBON, T. A. O.; CAETANO, F. H. Ultramorphology e histology of the ectal mandibular gland in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae). **Cytologia**, Tokio, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2003.
- PIETROBON, T. A. O.; CAETANO, F. H. Ultrastructure of the ectal mandibular gland of the paper wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). **Brazilian Journal of Morphological Science**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 5-12, 2004.
- PIMENTEL, M. A. L. **Influencia da cria na atividade dos corpora allata e no desenvolvimento dos ovários de abelhas operárias de *Apis mellifera* L., em condições experimentais.** Tese (Doutorado), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1990.
- REMBOLD, H. Caste specific modulation of juvenile hormone titres in *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry**, London, v. 17, n. 7, p. 103-106, 1987.
- RICHARDS, O. W. **The species of America, excluding the Vespinae.** London: British Museum, 1978.
- ROCHA, T. **Caracterização histoquímica e determinação do ciclo secretor da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae).** Dissertação ( Mestrado em Biologia Celular e Molecular), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2004.
- SHUEL, R. W.; DIXON, S. E. The early establishment of dimorfism in the female honeybee *Apis mellifera* L. **Insectes Sociaux**, Basel, v. 7, n. 3, p. 265-282, 1960.
- TILLMAN, J. A.; SEYBOLD, S. J.; JURENKA, R. A.; BLOMQUIST, G. J. Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 481-514, 1999.
- WEST-EBERHARD, M. J. The social biology of the Polistinae wasps. **Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology**, Ann Arbor, v. 140, p. 1-101, 1969.
- ZARA, J. F. **Caracterização morfo-histológica, histoquímica e ultra-estrutural da porção secretora da glândula salivar do quarto estágio larval de *Neoponera villosa* (Formicinae: Ponerinae).** Dissertação (Mestrado em Zoologia), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1998.
- ZARA, J. F.; CAETANO, F. H. Ultrastructure of the salivary gland of *Pachycondyla (=Neoponera) villosa* (Fabricius) (Formicinae: Ponerinae): Funcional chances during the last larval instar. **Cytologia**, Tokio, v. 67, p. 267-280, 2002.



## **CAPÍTULO 4**

### **Morte celular programada na glândula ectomandibular de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae).**

#### **Resumo**

Por meio de técnicas histoquímicas e ultra-estruturais estudou-se as características da morte celular programada da glândula ectomandibular de *Polistes versicolor*, buscando entender suas conseqüentes implicações etológicas-sociais. A glândula apresenta sinais de início do processo de morte celular em indivíduos entre 20 e 25 dias de idade chegando aos 50 dias com as células totalmente vacuolizadas. O tipo de morte observado apresenta características apoptóticas e não-apoptóticas, guardando semelhanças com tipos observados em outros insetos adultos.

#### **Abstract**

Through histochemical and ultra-structural techniques it was studied the programmed cell death characteristics of *Polistes versicolor* ectal mandibular gland trying to understand its social and ethologic implications. Signs of programmed cell death in this gland may be seen in individuals that were among 20 to 25 days old, arriving at 50 days old with the secretory cells cytoplasm extensively vacuolated. This programmed cell death presented

apoptotical and non-apoptotical characteristics, like observed in different adult insects.

## **Introdução**

O estudo da morte celular tem crescido rapidamente no meio científico (HÄCKER, 2000). Entre os fatores para este rápido crescimento está a alta aplicabilidade, como destacado por Haendchen (1998) quando aponta algumas patologias humanas relacionadas à morte celular, ainda inexplicadas e que vem intrigando os médicos por décadas.

Entre os primeiros estudos enfocando o tema morte celular, encontra-se o de Kerr *et al.* (1972), onde foi cunhado o termo apoptose. Anterior a este, encontram-se apenas trabalhos que indicam processos ou características morfológicas relacionadas à morte celular, mas sem ênfase em tal aspecto, como o de Vogt (1842 *apud* HÄCKER, 2000) que relata o desaparecimento de células durante o desenvolvimento de alguns organismos.

A morte accidental de uma célula é chamada de necrose e a que faz parte de um programa fisiológico normal de desenvolvimento de organismos multicelulares é chamada de morte celular programada (LOCKSHIN e WILLIAMS, 1964; LOCKSHIN, 1969, 1971). A morte celular programada ocorre para formar e estruturar tecidos e órgãos, desempenhando importante papel no desenvolvimento embrionário normal, morfogênese e de metamorfose (SILVA de MORAES, 1998).

Clarke (1990) organiza de acordo com características morfológicas, três tipos de morte celular: A morte do tipo 1 ou apoptose; do tipo 2 ou degeneração autofágica; e do tipo 3 ou degradação vesiculada não lisossomal, que pode ainda ser subdividida em 3a, desintegração não lisossomal e 3b, degeneração citoplasmática. Bowen (1997) separa em 4 classes os tipos de morte celular programada, sendo uma delas a apoptótica. A classificação dos demais tipos não apoptóticos está apoiada na morfologia, como proposto por Clarke (1990).

Estudos de classificação dos tipos de mortes celulares são importantes como base para qualquer estudo aplicado dos mecanismos e processos de morte.

Morfologicamente, na necrose, as células apresentam-se inchadas, devido ao grande influxo de água,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , pela desestruturação funcional da membrana. A função mitocondrial é afetada, gerando queda na síntese de ATP, comprometendo as demais funções celulares. Há perda de compartimentalização citoplasmática e rompimento de lisossomos com posterior lise da célula. No núcleo ocorre aumento da acidose, levando a precipitação picnótica da cromatina, sem marginalização da mesma (SILVA de MORAES, 1998).

Já na apoptose as células condensam-se por perda de água. Estas células, quando em tecidos, podem se separar das células vizinhas. A cromatina se condensa na periferia do núcleo e, num estágio mais avançado, o núcleo se condensa completamente, podendo assumir uma forma convoluta e constituir bolhas (“*blebs*”) entre as membranas do envoltório nuclear. A membrana plasmática também pode desenvolver bolhas. Somente no final de todo processo é que as bombas protéicas da membrana param de funcionar e as células deixam de excluir corantes vitais tais como Azul do Nilo e Azul de Tripán. Geralmente as organelas ficam intactas, podendo haver dilatação do retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. A produção de energia é mantida e, em alguns casos, a célula requer nova síntese de RNAm e proteínas. Finalmente, há a fragmentação da célula em esferas, que permanecem ligadas por membranas, sendo chamadas corpos apoptóticos, os quais são rapidamente fagocitados por células vizinhas ou fagócitos (HÄCKER, 2000).

A morte celular do tipo 2 de Clarke (1990) é caracterizada pelo aumento da atividade autofágica. As células que estão morrendo tornam-se ricas em lisossomos e observam-se numerosos vacúolos autofágicos. Ocorrem dilatações de organelas, tais como mitocôndrias e retículos endoplasmáticos. Não há marginalização cromatínica como na apoptose, mas podem aparecer núcleos picnóticos. Estes núcleos sobrevivem até sua extrusão da célula ou

autólise. Há mudanças na distribuição das hidrolases, com aumento inicial na atividade lisossômica autofágica de fosfatase ácida. Bowen e Bowen (1990) relatam o aparecimento de fosfatase ácida tanto livre no citoplasma quanto entre cisternas do retículo endoplasmático, a qual possui importante papel neste tipo de morte celular.

O tipo 3 de morte celular, descrito por Clarke (1990), é dividido em duas subclasses. A 3a (desintegração não lisossômica), onde pode-se observar a dilatação de organelas e formação de espaços vazios no citoplasma que se fundem, aumentando de tamanho e se ligando ao meio extracelular. A célula vai perdendo pedaços, resultando na total desintegração. A destruição do núcleo é tardia, mas de maneira similar a do citoplasma. Não há envolvimento de lisossomos e nem fagocitose pelas células vizinhas ou fagócitos. A morte do tipo 3b (degeneração citoplasmática) é caracterizada pela dilatação do núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e algumas vezes até mitocôndrias. Neste caso também ocorre a vacuolização do citoplasma, mas pode-se observar uma retração e arredondamento da membrana plasmática. A célula é geralmente fagocitada. Pode-se, por exemplo, induzir este tipo de morte pela retirada do fator de crescimento de nervos, o que causa atrofia das células e conseqüentemente sua morte. Por isso Bowen (1997) também a chama de morte por atrofia.

Bowen (1997, 1998) ainda considera que a especialização conduz ao envelhecimento e morte. Este mesmo autor ainda propõe a diferenciação celular como um quarto tipo de morte celular programada não apoptótica.

A maioria dos trabalhos de caracterização dos tipos de morte celular foi desenvolvida com vertebrados, sendo que os poucos que abordam invertebrados se referem principalmente a morte celular durante a metamorfose. Logo, trabalhos sobre morte celular em insetos adultos são bastante escassos. Entre eles Cruz-Landim e Silva de Moraes (1973) analisaram morfológicamente características da degeneração dependente da idade em glândulas hipofaríngeas da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Estas autoras descreveram a formação de estruturas degenerativas chamadas citolisomos. Estas são estruturas

relacionadas aos processos degenerativos de organelas citoplasmáticas, que são envolvidas por membranas e isoladas do resto do citoplasma. Dois tipos morfológicamente distintos destas estruturas puderam ser observados, todavia a análise histoquímica não mostrou qualquer diferença entre elas.

Silva de Moraes (1998) e Silva de Moraes e Bowen (2000) analisaram a morte celular da glândula hipofaríngea de *Apis mellifera* onde observaram que as células secretoras sofriam entumescimento, vacuolização do citoplasma, formação de grânulos grosseiros de cromatina e núcleos dilatados com dissolução dos nucléolos. Apesar das características morfológicas serem mais próximas da necrose, testes imunocitoquímicos revelaram características apoptóticas, tais como a fragmentação do DNA e externalização de fosfatidilserinas. A fosfatase ácida extracisterna era comum e abundante, característica de morte celular vacuolar ou autofágica. Em resumo, esta glândula apresenta morte celular programada com características similares à necrose, com fragmentação do DNA tardia, somadas as características de morte celular vacuolar, ficando difícil diagnosticar o tipo de morte celular em questão, com um dos já descritos.

Muitos autores têm descrito formas não apoptóticas ou aberrantes de morte celular durante a metamorfose e desenvolvimento de insetos (BOWEN *et al.*, 1993, 1996; LOCKSHIN e ZAKERI, 1996; SILVA de MORAES e BOWEN, 2000). Porém, exemplos de apoptoses clássicas também já foram descritas em insetos, durante seu desenvolvimento (GREGORC e BOWEN, 1997; MARGASSI e LAWRENCE, 1998; SCHMIDT-CAPELLA e HARTFELDER,, 1998).

Segundo Fortunato *et al.* (2000) em *Polistes dominulus* a glândula ectomandibular tem baixa atividade durante o inverno, enquanto as vespas hibernam, aumentando muito até o fim da primavera e caindo repentinamente no verão. Esta queda é marcada pela redução do número de organelas citoplasmáticas, aumento do número de grânulos eletrondensos, vacúolos e corpos residuais. Tais características sugerem que estas glândulas passem por um processo de morte celular programada, marcando o final do ciclo secretor. Da mesma forma, em glândulas ectomandibulares de *P. versicolor*, Pietrobon e Caetano (2004) encontraram células secretoras que apresentavam-se em

diferentes estágios de síntese, com variações morfológicas das organelas, numa seqüência que variava de células em plena atividade a células com características de morte celular. Estas células em processo de morte celular programada, assemelham-se às observadas por Fortunato *et al.* (2000), apresentando uma evolução para um estado completamente vacuolizado, semelhante também ao descrito por Silva de Moraes (1998) e Silva de Moraes e Bowen (2000) para glândula hipofaríngea de *A. mellifera*. Tais fatos nos levaram a crer que um processo semelhante de morte celular possa estar ocorrendo nas glândulas ectomandibulares de *P. versicolor*. Assim, por meio de técnicas histoquímicas e ultra-estruturais objetivamos descrever as características da morte celular programada na glândula ectomandibular de *P. versicolor*, buscando entender suas conseqüentes implicações etológicas-sociais.

## **Materiais e Métodos**

### **Preparação da glândula para microscopia de luz**

Quatro ninhos de *Polistes versicolor* foram selecionados, tendo seus indivíduos marcados e observados para determinação precisa da idade de cada indivíduo analisado. Ao todo 42 indivíduos foram utilizados.

Estes indivíduos foram coletados, anestesiados por redução de temperatura e, com auxílio de pinças e microtesoura, as glândulas ectomandibulares foram retiradas em placa de Petri de dissecção com solução fisiológica para insetos (NaCl 7,5g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38g/L; e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72g/L), sob estereomicroscópio. Também trabalhou-se com a cabeça inteira, fazendo-se pequenas aberturas nas laterais (na gena e olhos) e retirando-se o cípeo para melhor penetração das soluções utilizadas para fixação e emblocamento.

Este material foi fixado em paraformaldeído a 4%, por 4 horas e posteriormente colocado em tampão de fosfato de sódio por 24 horas. Foi desidratado por meio de sucessivos banhos de etanol 70% , 80% , 90% e (2x) 95%, de 30 minutos cada e, em seguida, imerso em solução de resina de embebição (Leica) com álcool 95% (1:1) durante 4 horas a temperatura

ambiente, para só então ser colocado em resina de embebição pura por 24 horas, a aproximadamente 4°C, para perfeita infiltração da resina no material.

Feito isto, o material foi passado para resina de inclusão (Leica) com polimerizador (Hardener), sendo uma parte de polimerizador para cada 15 partes de resina e mantido em estufa a 37°C, por mais 24 horas, para completa polimerização da resina, caracterizando o emblocamento.

Os blocos com material, assim confeccionados, foram colados em suportes, para serem cortados no micrótomo Leica RM 2145, com espessura entre 2,0µm e 5,0µm. Os cortes foram montados sobre lâminas para microscopia de luz (Corning).

Seguiram-se então as colorações e reações histoquímicas descritas a seguir.

### **Técnicas histoquímicas**

#### **Concentração crítica de eletrólitos (CEC) para diferenciação entre núcleo e ribonucleoproteínas.**

Os cortes foram hidratados de 10 a 30 minutos em água destilada. Em seguida foram corados com Azul de Toluidina, pH 4.0 por 20 minutos. Passado o tempo, as lâminas foram rapidamente lavadas e deixadas para secar. Seguiu-se, então, a reação com solução aquosa de MgCl<sub>2</sub> 0,05M, por 5, 7 e 10 minutos, para diferenciação. Novamente, foram lavadas em água destilada, deixando-se secar posteriormente e montando-se as lâminas em Bálsamo do Canadá.

#### **Azul de Toluidina para detecção de grupamentos ácidos e ácidos nucléicos**

Os cortes foram lavados em água destilada e depois colocados em solução de Azul de Toluidina 1% (1g de Azul de Toluidina; 1g de Borato de sódio; 1ml de álcool absoluto; e 100ml de água destilada) por 20 minutos. Passado o tempo, as lâminas foram lavadas, para se retirar o excesso do corante, secas e montadas com Bálsamo do Canadá.

### **Técnica de Feulgen para evidenciar DNA**

O material foi hidrolizado em solução de ácido clorídrico 5N, por 45 minutos. Em seguida foi lavado em água destilada por 5 minutos para então ser corado com reativo de Schiff por 1 hora, no escuro. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas e montadas em Bálsamo do Canadá.

### **Técnica de Sudan Black B para evidenciar lipídios.**

As secções do material foram imersas por poucos segundos em etanol 70%. Em seguida, mergulhadas em solução saturada de Sudan Black B em etanol 70%, por 45 minutos. Novamente realizou-se outro banho em etanol 70%, por 2 minutos, para diferenciação. As lâminas foram montadas em gelatina para evitar que a diafanização retirasse a marcação.

### **Técnica de Xilidine Ponceau para marcação de proteínas totais (MELLO e VIDAL, 1980)**

Os cortes foram hidratados em água destilada, durante 1 minuto. Posteriormente foram corados com solução de Xylidine Ponceau (0,1g de Xylidine Ponceau em 100 ml de ácido acético a 2% com pH 2,5) por 15 minutos, lavados em ácido acético a 2% por 30 minutos e novamente lavados em água destilada. As lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá.

### **Técnica de PAS e Alcian Blue (coloração simultânea) para evidenciar glicoconjugados ácidos e neutros com grupamentos 1,2 glicol (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983).**

Os cortes foram hidratados e em seguida corados em solução de Azul de Alcian 1% em ácido acético, por 30 minutos e a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada, para depois serem coradas em ácido periódico a 1%, por 5 minutos a temperatura ambiente. Após nova lavagem em água destilada, foram colocadas no reagente de Schiff por 15 minutos, no escuro e também a temperatura ambiente. Uma última lavagem



em água corrente, por 5 a 10 minutos, se fez necessário antes da montagem das lâminas em Bálsamo do Canadá.

### **Montagem das lâminas**

Para montagem em gelatina glicerinada, com um bastão de vidro foi colocado uma gota da gelatina, previamente liquefeita em estufa a 60°C, sobre os cortes, cobrindo-os com a lamínula. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e mantidas em geladeira.

Para montagem em Bálsamo do Canadá, as lâminas foram diafanizadas com 1 banho em xilol de 3 minutos. Os cortes foram então cobertos com Bálsamo do Canadá sintético e lamínula, deixando-se em estufa, a 37°C, para completar a secagem. O processo de diafanização não foi realizado para todas as técnicas.

### **Preparação para Ultra-estrutura**

Após rápida anestesia por redução da temperatura, a glândula ectomandibular foi dissecada em solução fixadora e mantidas nesta solução (Karnovsky modificado: 84ml/L de glutaraldeído 25,0%, 500ml/L de paraformaldeído 8,0% e tamponado com tampão fosfato de sódio 0,2M, pH=7.3, q.s.p. 1 Litro) por 24 horas, para completa fixação. Vencido o prazo seguiram-se dois banhos com tampão cacodilato de sódio 0,1M de 15 minutos cada.

A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1% em água, por 2 horas. Uma nova lavagem com tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 15 minutos, e outra com etanol 10% também por 15 minutos, enceraram esta etapa.

O contraste foi feito com acetato de uranila 2% em etanol 10% (1:1), imergindo-se o material na solução por, no mínimo, 12 horas e na ausência de luz. Seguiu-se então a desidratação com uma série de banhos em etanol, nas concentrações 70%, 90%, 95% e (3x) 100% de 15 minutos cada. Outros dois banhos, também de 15 minutos, um com etanol 100% e acetona P.A., na proporção de 1:1, e outro apenas em acetona P.A., se fizeram necessários.

Em seguida o material foi imerso em solução de acetona e resina (1:1) por 12 horas, seguindo-se a embebição em resina pura, por mais 24 horas.

A inclusão foi realizada com resina (23,9gr de Araldite 6005 (Epoxy Casting Resin A, da Cargille); 30,8gr de Epon 812 (Poly/Bed 812 Embedding Mediam, da Polysciences); e 49,9gr de DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride, da SPI-CHEM)), adicionando-se 4g do catalisador DMP-30 (2,4,6-tridimetilaminometilfenol, da Balzers Union), sendo mantido em estufa a 60°C por 24 horas, para total polimerização da resina.

Os blocos assim confeccionados foram cortados, com espessura entre 1500A<sup>o</sup>(angstroms) e 2000A<sup>o</sup>, no ultramicrótomo Sorvall MT2-B, utilizando-se navalhas de vidro. Os cortes foram dispostos em telas para microscopia eletrônica de transmissão e contrastados para observação.

A contrastação do material cortado se deu em placa de Petri tampada e isolada da luz, colocando-se as telas sobre gotas de acetato de uranila 5,0 gr/L, por 45 minutos, sendo, posteriormente, lavadas com água destilada durante aproximadamente 30 segundos. A contrastação seguiu-se com citrato de chumbo 4,0 gr/L em NaOH 10N, por 15 minutos. Junto, na placa de Petri, foram colocadas pastilhas de NaOH para evitar a precipitação de chumbo. Após estas etapas as telas foram lavadas em NaOH 0.02M, por, aproximadamente, um minuto e em água bidestilada e deionizada, também por um minuto.

O material assim processado foi analisados e fotografado no microscópio eletrônico de transmissão CM 100 Philips.

## **Resultados e Discussão**

Apesar de tratarmos da morte celular, uma breve descrição da situação inicial da célula glandular se faz necessário para comparação e verificação das alterações sofridas.

A glândula ectomandibular de *Polistes versicolor* foi descrita como um conjunto de células secretoras isoladas, ligadas a um reservatório sacular, por meio de canálculos quitinosos (CONTE e CRUZ-LANDIM, 1997; PIETROBON e CAETANO, 2003). Histologicamente, estas células secretoras apresentam o núcleo levemente deslocado para periferia, com um ou mais nucléolos

presentes (PIETROBON e CAETANO, 2003). Quando analisada do ponto de vista ultra-estrutural, observam-se variações ao longo de seu ciclo secretor, que culminam em células com características apoptóticas (PIETROBON e CAETANO, 2004).

Indivíduos recém-emergidos já apresentam a glândula ectomandibular completamente formada, não havendo evidências de divisão celular após a emergência, da mesma forma que observado em outros Hymenoptera (CAETANO *et al.*, 2002). Suas células secretoras apresentam grandes invaginações no envoltório nuclear, na porção do núcleo voltada para o centro da célula (fig.1A). Tais invaginações estão relacionadas ao aumento da superfície, sendo um indicativo de alta taxa de síntese, por necessitar de ampliação da superfície de troca entre o núcleo e o citoplasma.

A coloração pelo método de CEC, que se utiliza do azul de Toluidina e a variação na concentração de cátions, para diferenciar RNA do DNA (MELLO e VIDAL, 1989; MONTEIRO, 1993; MELLO e FALCO, 1996), mostra o DNA descondensado, a presença de um grande nucléolo e distribuição homogênea do RNA no citoplasma (fig.1B). Tal condição foi reforçada pelos demais testes para ácidos nucléicos empregados (técnicas de Azul de Toluidina e Feulgen), o que condiz com o descrito por Pietrobon e Caetano (2004), que relatam células inicialmente com características que indicam alta taxa de síntese.

Já com 20 dias, pode-se observar que as células secretoras, de alguns indivíduos, perderam as invaginações do envoltório nuclear, mas sem haver aumento de tamanho do núcleo (fig.2A). O DNA continua descondensado e o nucléolo ainda formado, porém no citoplasma observa-se maior concentração de RNA na periferia da célula (fig.2B), deixando um espaço pouco marcado pelo corante no centro da célula. Ultra-estruturalmente, nesta região central encontra-se o canalículo coletor da secreção (PIETROBON e CAETANO, 2004) e, nesta fase, já ocorre acúmulo de vesículas de secreção na região ao redor desta região central. Assim, pode-se supor que a redução do RNA citoplasmático nesta região se deva ao processo de captação da secreção e conseqüente marginalização da maquinaria de síntese da célula.

A glândula dos indivíduos com idade entre 25 e 30 dias apresentam início da vacuolização do citoplasma, na região central da célula. Estes vacúolos não se apresentam marcados para proteínas, lipídios ou glicoconjugados (fig.3A, 4A, 4B, respectivamente), ao contrário das vesículas de secreção também presentes (fig.3A), apesar de não se encontrarem vazios (fig.6A). Quando analisado ultra-estruturalmente, observa-se que existe maior concentração de vesículas de secreção ao redor de figuras mielínicas e vacúolos (fig.6A). Estes vacúolos estão preenchidos por uma substância heterogênea e pouco eletrondensa (fig.6A). O DNA nuclear já se encontra mais compactado em algumas células, enquanto os nucléolos e citoplasma encontram-se basicamente idênticos ao descrito anteriormente (fig.3B). Figuras mielínicas são estruturas envolvidas em processos normais de degradação e ciclagem de membranas, comuns em células secretoras. Possivelmente, as figuras mielínicas aqui observadas (fig.6A), estejam relacionadas à liberação de secreção, antes acumulada nas vesículas.

Assim como já descrito por Pietrobon e Caetano (2004), alterações nas organelas também puderam ser observadas neste estágio do ciclo secretor, como a dilatação do complexo de Golgi e retículo endoplasmático, o que foi interpretado por estes autores como possível mudança na secreção sintetizada. Porém, como destacado por Häcker (2000), células em apoptose podem sofrer dilatação do Golgi e retículo endoplasmático precocemente, além de vacuolização do citoplasma. Assim, não se pode descartar a possibilidade de tais alterações serem na verdade sinais precoces da morte celular programada.

Finalmente, indivíduos com 50 dias ou mais, apresentavam as células secretoras totalmente vacuolizadas (fig.6B), porém com as vesículas preenchidas por substância formada por glicoconjugados neutros, evidenciados pela técnica de PAS (fig.5A). O núcleo não é mais facilmente distinguível do citoplasma pela coloração de CEC e ainda há RNA no citoplasma, por entre os numerosos vacúolos (fig.5B). Ultra-estruturalmente observam-se também fagossomos e figuras mielínicas (fig.6B) e nenhuma organela encontra-se presente. O núcleo apresenta-se disforme, com o nucléolo ainda presente e o

DNA totalmente condensado, disposto ao redor deste nucléolo (fig.6B). A manutenção do nucléolo está relacionada à manutenção da síntese de RNA até o final do processo, o que é evidenciado pela presença do RNA no citoplasma, constituindo mais uma característica já descrita para células apoptóticas (HÄCKER, 2000). Porém a vacuolização total da célula remete ao tipo 3 de morte celular, proposto por Clarke (1990), mais especificamente ao tipo 3b pois as organelas também apresentaram dilatação, como já mencionado, o núcleo e a membrana plasmática se mantiveram íntegros, sem haver ligação dos vacúolos intracelulares com o meio externo.

Quanto às células do reservatório, basicamente não se observaram variações histoquímicas em relação à idade, porém ultra-estruturalmente pode-se notar algumas características do processo de morte destas células. De acordo com Pietrobon e Caetano (2004) estas são células delgadas e unidas umas as outras por meio de interdigitações e junções septadas. Apresentam ainda características secretoras, com um conjunto de organelas relativamente bem desenvolvidas, quando jovens. Já em estágios mais avançados, observamos que o citoplasma passa a apresentar estruturas mais esparsas, havendo grandes lacunas entre elas (fig.7A,C). As organelas tornam-se escassas, sendo as mitocôndrias e ribossomos livres as mais numerosas (fig.7A). Alguns vacúolos se formam, as mitocôndrias se alinham às junções celulares (fig.7A) e o retículo endoplasmático rugoso apresenta dilatações de suas cisternas (fig.7B). Já o núcleo perde seu nucléolo, porém sem haver compactação da cromatina. Formam-se *blebs* no envoltório nuclear, ou seja, as membranas do envoltório se separam, formando uma bolha no núcleo (fig.7C).

Assim como Pietrobon e Caetano (2004), também se observa a presença de figuras mielínicas e mitocôndrias derivadas. As figuras mielínicas agora observadas, assim como aquelas encontradas nas células secretoras completamente vacuolizadas, podem estar mais relacionadas aos processos autofágicos, uma vez que quase não se encontram organelas nesta fase e que nas células do reservatório não foram observadas vesículas de secreção que justifiquem uma ciclagem tão grande de membranas. Ratcliffe e King (1967) reportaram mudanças em mitocôndrias relacionadas à processos autofágicos,

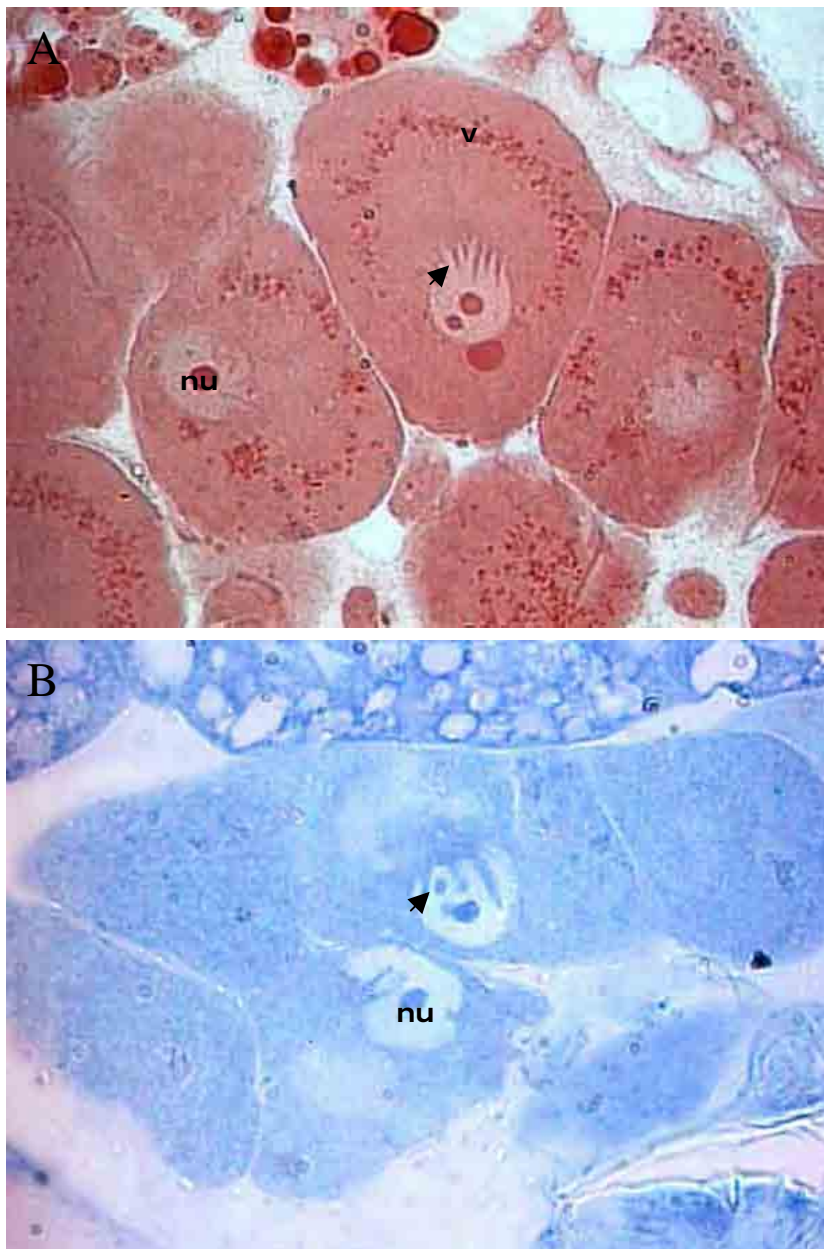
formando gotas lipídicas e figuras mielínicas, em *Nasonia vitripennis*. Cruz-Landim e Silva de Moraes (1973) também descreveram estruturas lamelares envolvidas em organelas, que denominaram citolisomos, relacionadas à degeneração celular e que pode representar um estágio antecessor das figuras mielínicas observadas em *P. versicolor*.

Isto posto, pode-se listar uma série de características que aproximam este tipo de morte com a apoptose, como alteração das organelas precocemente, manutenção do núcleo e nucléolo até o final do processo e a formação de “*blebs*” no envoltório nuclear. Porém pode-se listar também características de necrose, como não marginalização da cromatina condensada e dilatação da célula e núcleo. Além da necrose, estas características também se aproximam bastante de outros tipos de morte celular, como a vacuolar de Clarke (1990). Isto pode sugerir que diferentes formas de morte celular podem ocorrer durante o desenvolvimento, como proposto por Clark (1990) e Lockshin e Zakeri (1996) ou que este seja um novo tipo morfológico de morte celular programada. Bowen *et al.* (1998) descreve alguns exemplos de morte celular vacuolar, não apoptótica, em vários invertebrados, incluindo insetos. Silva de Moraes (1998) e Silva de Moraes e Bowen (2000) também descrevem um processo de morte celular diferenciado em glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera*. Todos estes trabalhos apresentam resultados bastante próximos dos agora descritos para glândula ectomandibular de *P. versicolor*, o que poderia realmente sugerir que um tipo de morte, diferenciado dos até agora descritos, esteja ocorrendo nestes animais, cabendo apenas uma sistematização de todos estes dados e alguns novos ensaios para confirmação.

Apesar de toda comparação acima discutida estar dividida por idades, é importante ressaltar que tudo se baseia em tendências, pois se observou muita variação destas características quanto à idade, apesar do início das características de morte coincidirem com o tempo de vida médio calculado por Gobbi (1977), que é de 17 dias para subordinadas. Certo é que apenas a seqüência de fatos que culminam na morte da célula está corretamente representada e que outro fator, e não apenas a idade, poderia apresentar influência na determinação do ciclo secretor.

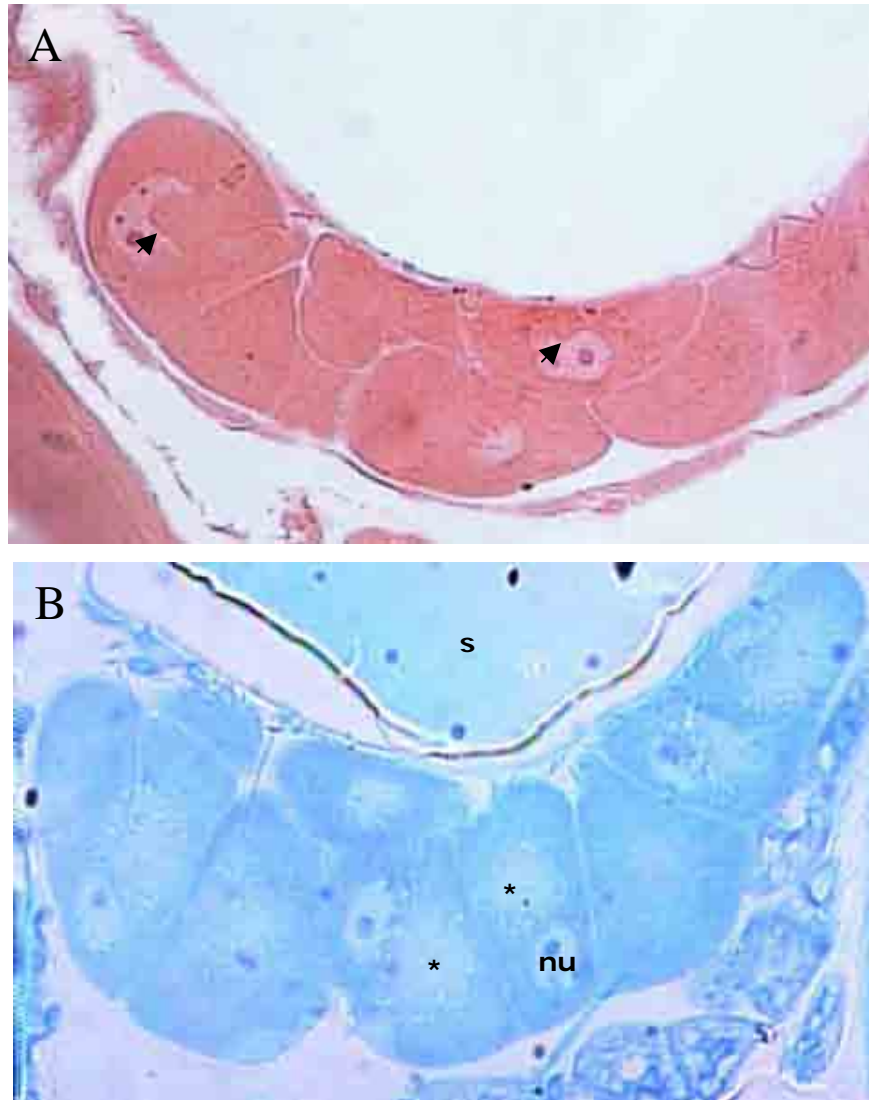
Assim, pode-se concluir que a glândula ectomandibular de *P. versicolor* apresenta-se em franca atividade nos primeiros dias de vida, chegando a acumular secreção após algumas semanas, significando que sua função deva estar relacionada às atividades desta fase da vida, mas que ainda não está clara. De qualquer maneira, ao longo do desenvolvimento esta glândula apresenta alterações que culminam na morte, não concomitantemente, de suas células. A morte da glândula não interfere nas relações e posições hierárquicas, uma vez que observam-se dominantes e subordinadas forrageiras com idades avançadas e a glândula completamente inativa. Por fim, o processo de morte observado não se enquadra à apenas um dos modelos já descritos, porém guarda muitas semelhanças com processos de morte celular observados em outros invertebrados, sugerindo ser talvez um novo tipo morfológico.

### Documentação Fotográfica

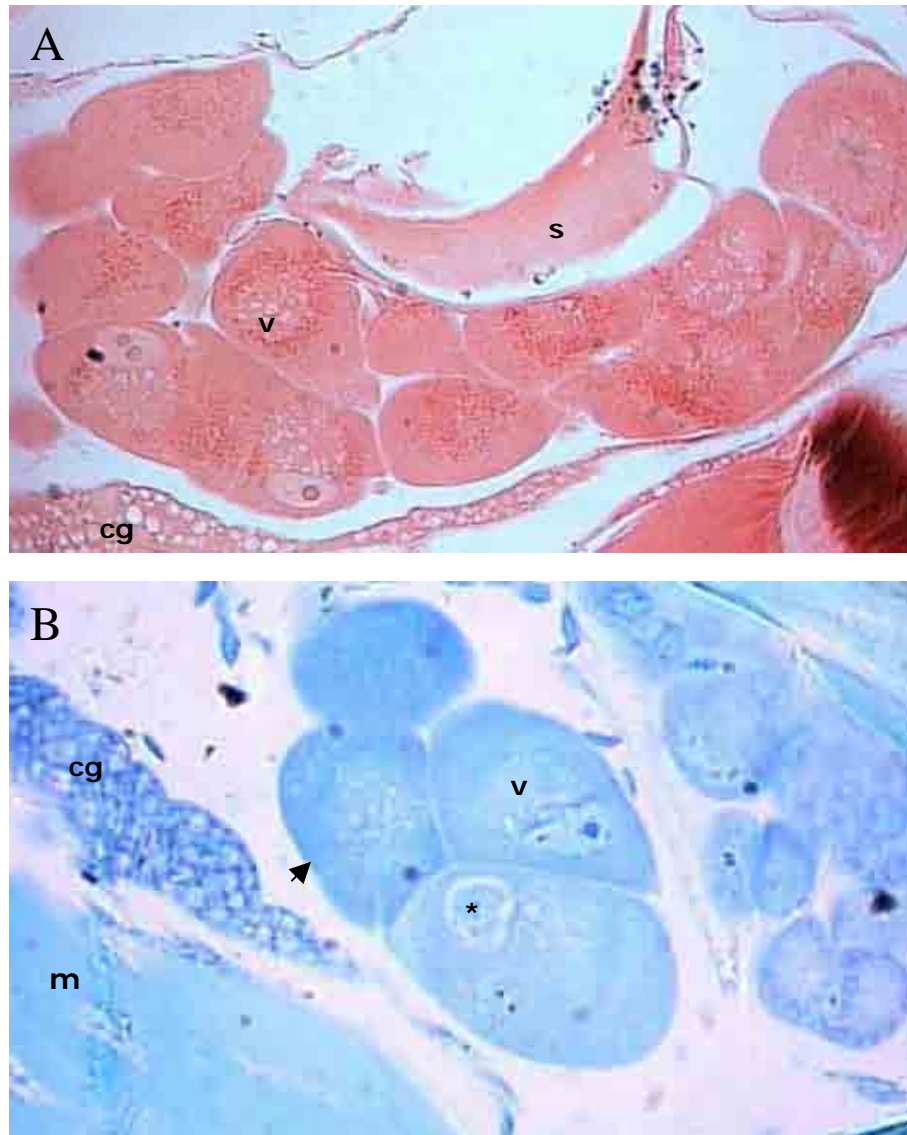


**Figura 1** Células secretoras da glândula ectomandibular de *Polistes versicolor* recém emergidas. A. Coradas com Xilidine Ponceau, evidenciando invaginações do envoltório nuclear (seta). B. coradas pelo método de CEC, mostrando as condições normais do DNA e RNA nestas células. Note o nucléolo (nu) bem desenvolvido e baixa concentração de DNA condensado. Vesículas de secreção já presentes no citoplasma (v) (aumentos 1000x).

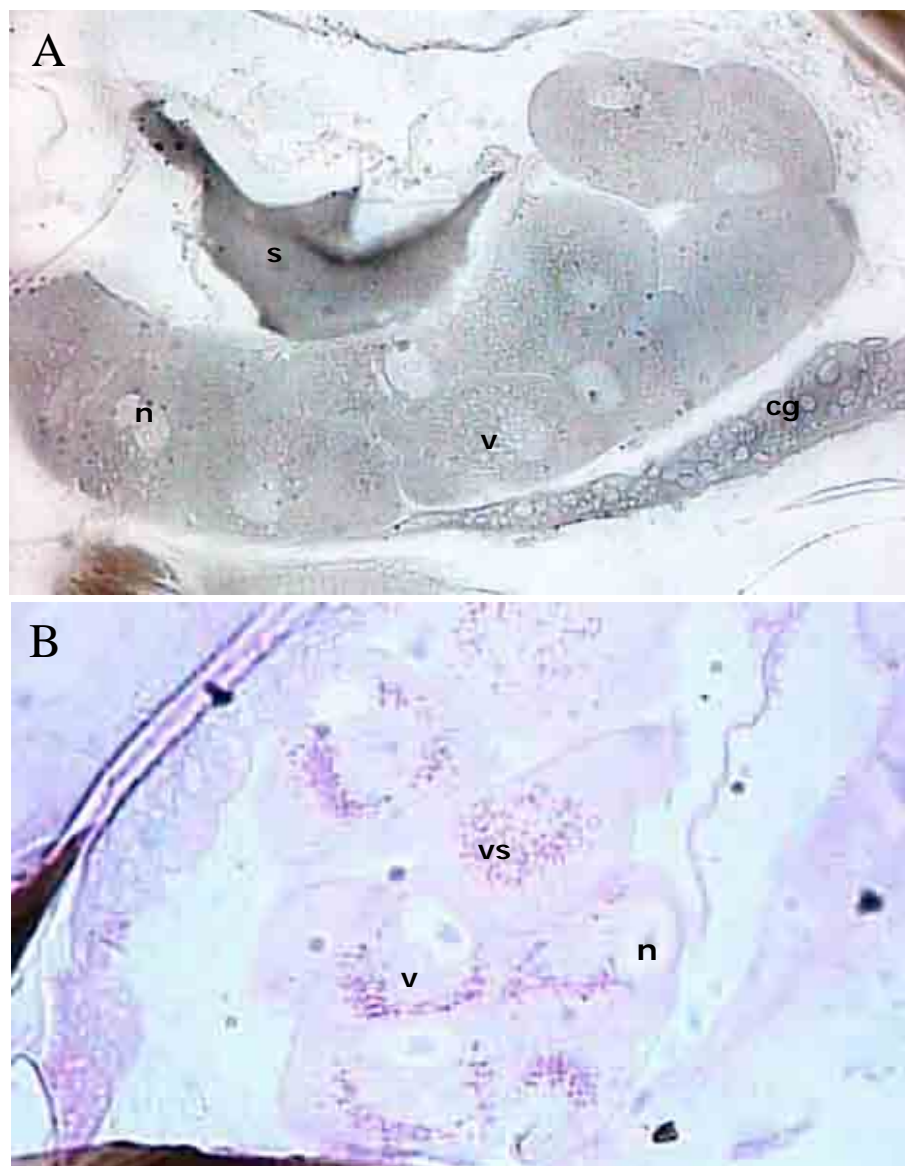




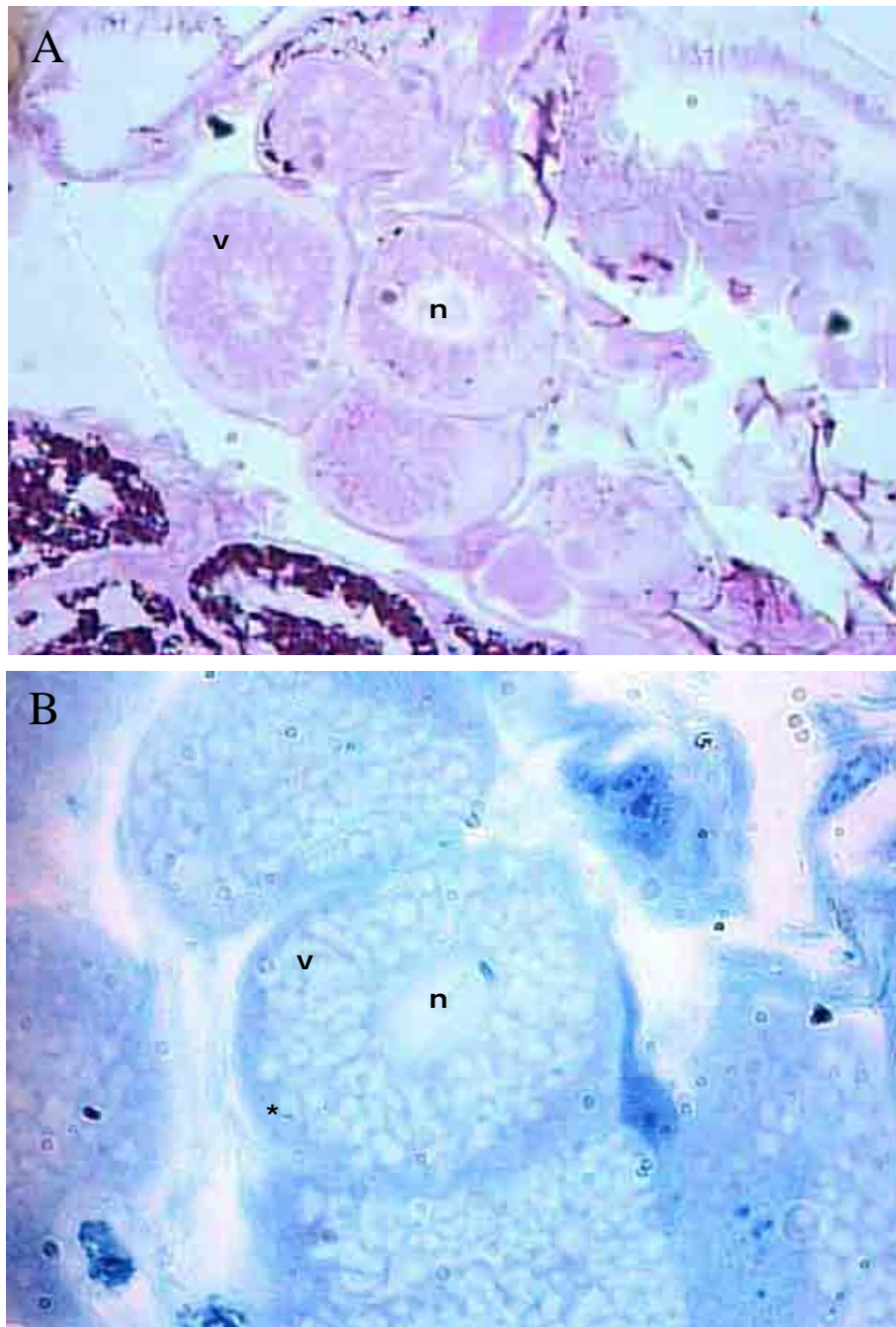
**Figura 2** A. Células secretoras de indivíduo com 20 dias, onde observa-se a perda das invaginações do envoltório nuclear (seta) em algumas células. B. CEC em glândula de indivíduos com a mesma idade, mostrando que o núcleo continua normal, porém no citoplasma observa-se maior concentração de RNA na periferia da célula, com formação de área mais clara no centro da célula (\*), possivelmente pelo acúmulo de secreção (s) (aumentos 400x).



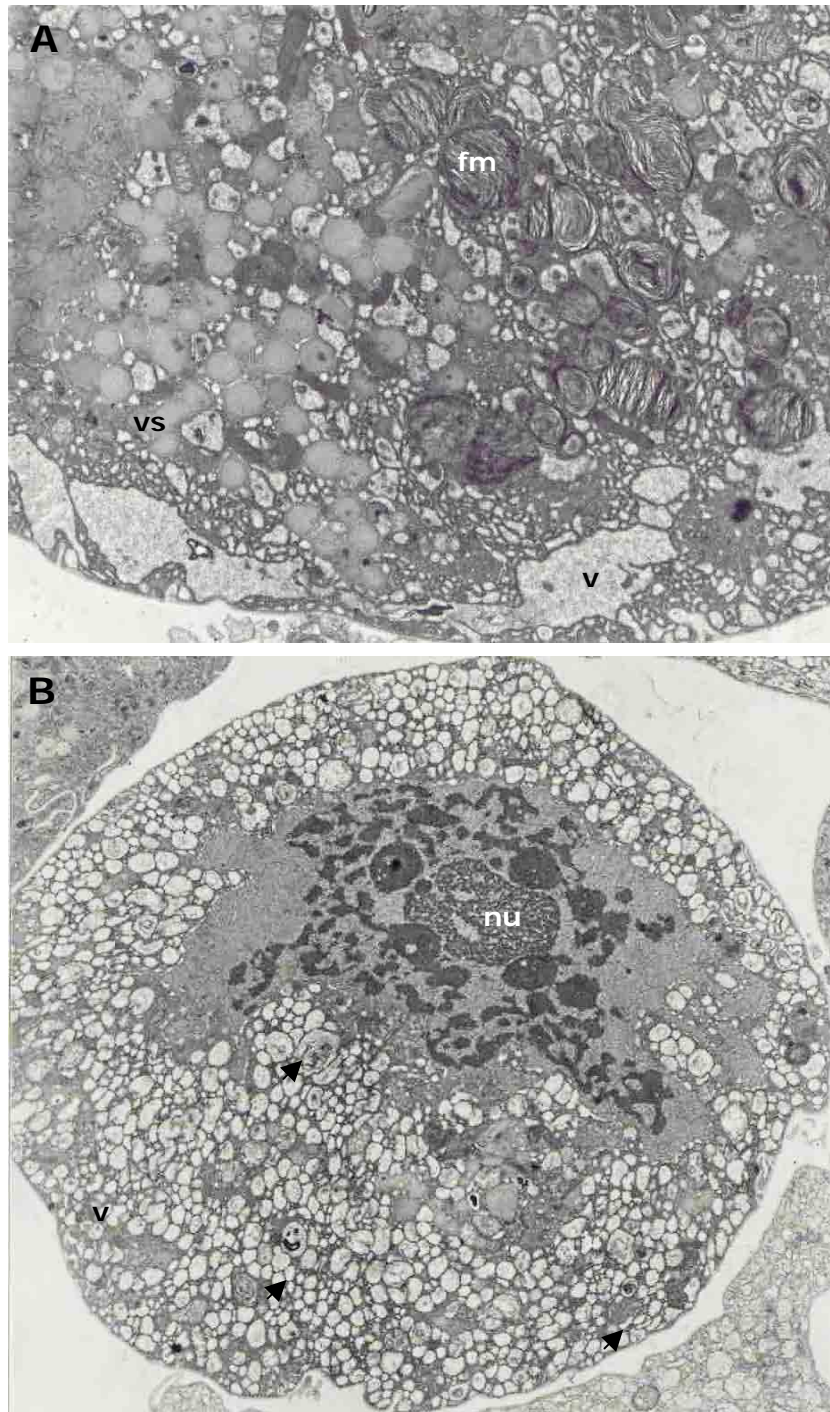
**Figura 3** Células secretoras de indivíduo com 25 dias mostrando o início da vacuolização do citoplasma na região central da célula. Note que os vacúolos (v) não apresentam-se marcados para proteínas em (A). Em B vemos o resultado do CEC, onde observa-se uma célula com o DNA mais condensado e centralizado no núcleo (\*) e alta concentração de RNA marginalizado no citoplasma (seta). Núcleo (n). Corpo gorduroso (cg). Musculatura (m). Secreção no reservatório (s) (aumentos A 400x; B 500x).



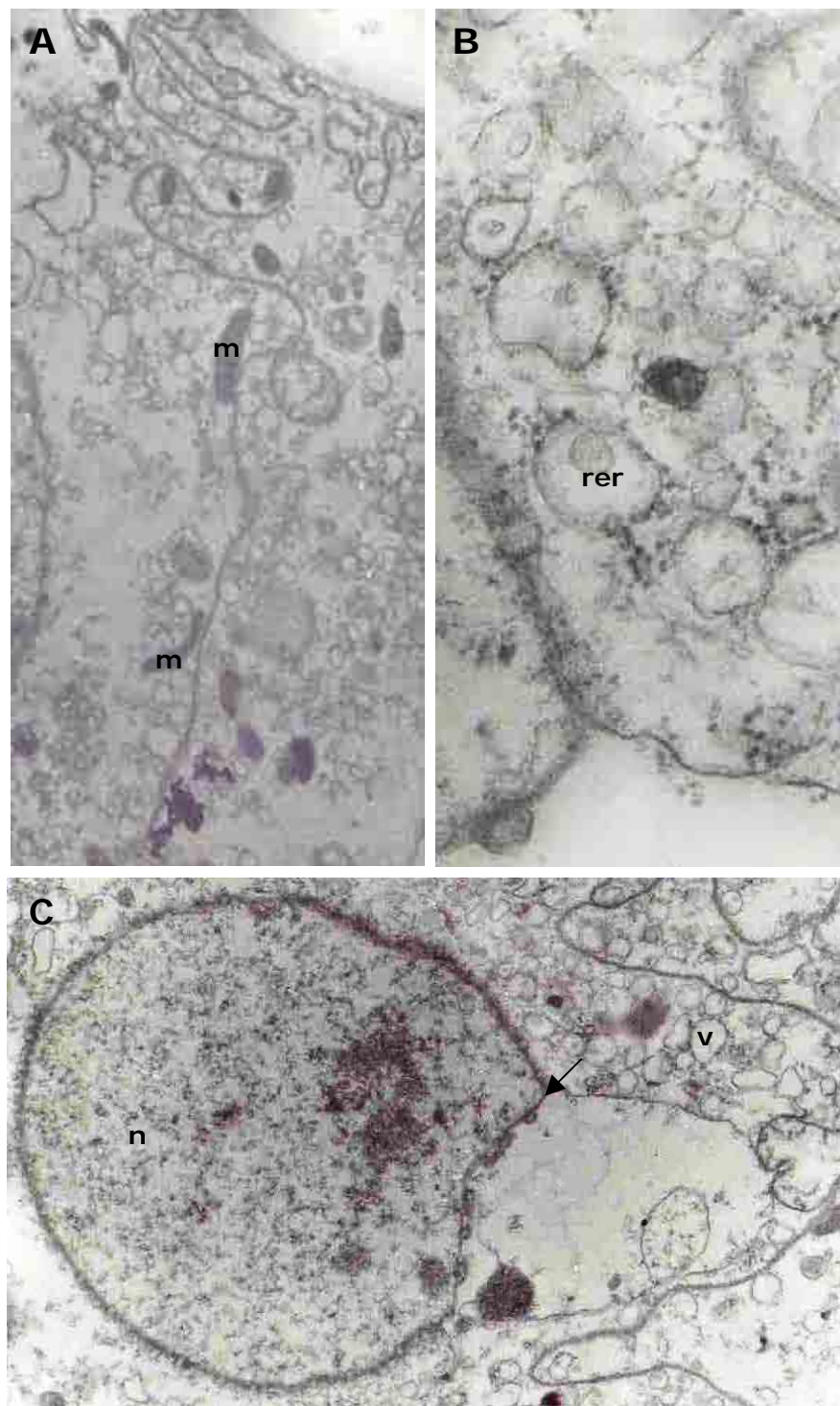
**Figura 4** Células secretoras de indivíduo com 25 dias onde observa-se o início da vacuolização do citoplasma na região central da célula. Em (A) a técnica de Sudan Black evidenciou a ausência de lipídios nestes vacúolos, enquanto em (B) notam-se vacúolos sem marcação para glicoconjugados, diferentemente das vesículas de secreção (vs). Núcleo (n). Corpo gorduroso (cg). Musculatura (m). Secreção no reservatório (s) (aumentos C 400x; D 500x).



**Figura 5** Indivíduos com 56 dias apresentando as células secretoras totalmente vacuolizadas e hipertrofiadas, porém com as vesículas preenchidas por substância formada por glicoconjugados, como evidenciado em A pela técnica de PAS. Em B nota-se que o núcleo é pouco distinguível do citoplasma pela coloração de CEC e que ainda há marcação de RNA no citoplasma (\*) por entre os vacúolos e na periferia da célula. Vacúolos (v). (aumentos 500x).



**Figura 6** Micrografias eletrônica das células secretoras da glândula ectomandibular de *P. versicolor* onde observam-se em A as vesículas de secreção (vs) por entre figuras mielínicas (fm) e vacúolos (v) preenchidos por substância heterogênea e pouco eletrondensa (7250x). Em C uma vista geral da célula completamente vacuolizada, com vacúolos autofágicos e figuras mielínicas (setas) porém mantendo intacto seu núcleo, disforme, com um grande nucléolo (nu) e o DNA condensado ao redor deste nucléolo (4050x).



**Figura 7** Micrografias eletrônica das células do reservatório da glândula ectomandibular de *P. versicolor* onde destacam-se em A as mitocôndrias (m) alinhando-se junto às junções celulares e a vacuolização do citoplasma (7250x). Em B observam-se ribossomos livres presentes e a dilatação das cisternas do retículo endoplasmático rugosos (rer), enquanto em C destaca-se o núcleo da mesma célula formando um *Bleb* (seta), ou seja, uma disjunção das membranas do envoltório nuclear originando uma bolha (41000x e 14500x respectivamente).

## Bibliografia

- BOWEN, I. D. Apoptosis an altruistic cell death. **Cancer Research Wale Report**, Wale, v, p. 12-15, 1997.
- BOWEN, I. D. Apoptosis and programmed cell death. In: YU, B. P. (Org.) **Method in aging development**. p.453-473, 1998.
- BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M. **Programmed cell death in tumour and tissues**. London e New York: Chapman and Hall, 1990.
- BOWEN, I. D.; MORGAN, S. M.; MULLARKEY, K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. **Cell Biology International**, London, v. 17, p. 13-33, 1993.
- BOWEN, I. D.; MULLARKEY, K.; MORGAN, S. M. Programmed cell death in the salivary gland of the blow fly *Calliphora vomitoria*. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 34, p. 202-217, 1996.
- BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M.; JONES, A. H. **Mitosis and apoptosis: matters of life and death**. New York: Chapman & Hall, 1998.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. **Formigas: biologia e anatomia**. Araras: Gráfica e Editora Topázio, 2002.
- CLARKE, P. G. H. Developmental cell death: morfological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 181, p. 195-206, 1990.
- CONTE, H.; CRUZ-LANDIM, C. Scanning Electron Microscopy of the Mandibular Gland of *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 1, p. 147-150, 1997.
- CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R. L. M. Degenerative structures in the hypopharyngeal gland from aging bees (*Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.). **Revista de Biologia**, Lisboa e Rio de Janeiro, v. 9, n. 1-4, p. 157-168, 1973.
- FORTUNATO, A.; TURILLAZZI, S.; DELFINO, G. Ectal mandibular gland in *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae): ultrastructural modifications over the secretory cycle. **Journal of Morphology**, Michigan, v. 244, p. 45-55, 2000.
- GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor***. Tese (Doutorado em Genética). USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1977.
- GREGORC, A.; BOWEN, I. D. Programmed cell death in the honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. **Cell Biology International**, London, v. 21. n. 3, p. 151-158, 1997.
- HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 301, p. 5-17, 2000.

- HAENDCHEN, R. V. Apoptose miocárdica: um novo mecanismo de morte celular. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 65-68, 1998.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Santos, 1983.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 26, p. 239-256, 1972.
- LOCKSHIN, R. A. Programmed cell death: activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 15, p. 1505-1516, 1969.
- LOCKSHIN, R. A. Programmed cell death: nature of nervous signal controlling breakdown of intersegmental muscle. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 17, p. 149-158, 1971.
- LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of breakdown of the intersegmental muscle of silkworms. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 10, p. 643-649, 1964.
- LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. The biology of the cell death and its relationship to ageing. In: HOLBROOK, N. J.; MARTIN, G. R.; LOCKSHIN R. A. (Org.) **Cellular aging and cell death**. New York: Wiley-Liss, p. 167-180, 1996.
- MARGASSI, L.; LAWRENCE, P. A. The pattern of cell death in fushi tarazu a segmentation gene of *Drosophila*. **Development**, Cambridge, v. 104, p. 447-451, 1998.
- MELLO, M. L. S.; FALCO, J. R. P. Critical electrolyte concentration of DNA-protein complexes in somatic cell nuclei of the honey bee. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 26, p. 793-795, 1996.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. **Práticas de biologia celular**. Campinas: Edgar Blucher, 1980.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, Cambridge, v. 59, p. 87-93, 1989.
- MONTEIRO, A. L. P. **Concentração crítica de eletrócitos em cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae)**. Dissertação (Mestrado), UNICAMP, Instituto de Biologia, Campinas, 1993.
- PIETROBON, T. A. O.; CAETANO, F. H. Ultramorphology e histology of the ectal mandibular gland in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae). **Cytologia**, Tokio, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2003.



- PIETROBON, T. A. O.; CAETANO, F. H. Ultrastructure of the ectal mandibular gland of the paper wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). **Brazilian Journal of Morphological Science**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 5-12, 2004.
- RATCLIFFE N. A.; KING P. E. The venom system of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Vespidae). **Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, London, v. 42, p. 49-61, 1967.
- SCHMIDT-CAPELLA, I. C.; HARTFELDER, K. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in cast-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, p. 385-391, 1998.
- SILVA DE MORAES, R. L. M. **Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. Tese (Livre-Docência), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1998.
- SILVA DE MORAES, R. L. M.; BOWEN, I. D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera*). **Cell Biology International**, London, v. 24, n. 10, p. 737-743, 2000.

## **CAPÍTULO 5**

### **Presença de partículas virais no núcleo de células epiteliais e hemócitos de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae).**

#### **Resumo**

Patologias descritas para vespas adultas são raras na literatura. Neste trabalho são mostradas partículas virais no núcleo das células epiteliais, próximas à glândula ectomandibular, e hemócitos de *Polistes versicolor*. As partículas virais observadas assemelham-se morfologicamente à *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), sendo que as células infectadas apresentam-se hipertrofiadas. A ingestão da hemolinfa de lagartas infectadas constitui a mais provável via de infecção destes vírus em *P. versicolor*.

#### **Abstract**

Descriptions of adults wasps pathologies are rare in the literature. This work shows the presence of viral particles in the nucleus of the epithelial cells, near to the ectal mandibular gland, and haemocytes of *Polistes versicolor*. The characteristics of infected cell and the viral morphology resemble a *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). The ingestion of infected prey's haemolymph constitutes the most probable infection way in *P. versicolor*.

## Introdução

A literatura sobre patologias em vespas é escassa, porém observações de canibalismo e descarte de indivíduos pré-emergentes, além de morte de recém emergidas, são comuns em algumas vespas (GOBBI, 1977; GIANNOTTI, 1992). Tais fatos foram comumente atribuídos ao parasitismo, mau formação ou doença, uma vez que canibalismo por escassez de alimento ocorre principalmente com larvas em estágios precoces do desenvolvimento, onde ainda não foi investida grande quantidade de energia.

Os *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs), da família Baculoviridae, são vírus entomopatógenos, isolados de mais de 600 espécies de insetos hospedeiros (TINSLEY e HARRAP, 1978; HARRAP e PAYNE, 1979), sendo atualmente muito usados no controle biológico de pragas (MATOS *et al.*, 1999). Larvas de Lepidoptera são particularmente susceptíveis a tais vírus (MATOS *et al.*, 1999) e como é amplamente difundido entre os entomologistas, as vespas são grandes predadoras destas larvas (CARPENTER e MARQUES, 2001).

De acordo com Matos *et al.* (1999) a via de infecção mais comum nas larvas de Lepidoptera é a ingestão do poliedro, que infecta o epitélio do intestino médio, onde se replica e se lança para infestação sistêmica de outros tecidos.

O presente trabalho apresenta partículas virais semelhantes à *Nucleopolyhedrovirus* no núcleo de células epiteliais da mandíbula de *P. versicolor*, descrevendo sua morfologia e das células infectadas, e interpretando a possível via de infecção.

## Materiais e Métodos

Forrageiras de *Polistes versicolor* foram coletadas e suas mandíbulas, glândulas ectomandibulares e tecidos anexos foram dissecados e fixados em Karnovsky modificado (84ml/L de glutaraldeído 25,0%, 500ml/L de paraformaldeído 8,0% e tamponado com tampão fosfato de sódio 0,2M, pH=7.3, q.s.p. 1 Litro). A pós-fixação se deu em tetróxido de ósmio 1%. O contraste foi realizado com acetato de uranila 2%, seguindo-se a desidratação por meio de série crescente de etanol, de 70% a 100%.

O material foi incluído em resina com catalisador DMP-30, sendo mantido em estufa a 60°C para total polimerização da resina.

Os blocos foram cortados com espessura entre 1500 e 2000 angstroms, no ultramicrotomo Sorvall MT2-B. A contrastação foi realizada com acetato de uranila e citrato de chumbo. O material foi analisado e fotografado no microscópio eletrônico de transmissão CM 100 Philips.

## Resultados

As células epiteliais de *P. versicolor*, que se apresentam infectadas pelo vírus, se mostram com núcleo hipertrofiado e material cromatínico rodeado por grupos de vírus, citoplasma rico em mitocôndrias e ribossomos livres (fig.1A). Não se observou a presença de retículo endoplasmático e outras organelas. No interior do núcleo inúmeras partículas virais podem ser observadas por entre o estroma viral, de aparência homogênea e de granulação fina, que compacta a cromatina na periferia do núcleo (fig.1B).

Os vírus estão dispostos em grandes grupos ou, mais raramente, isolados (fig.1B). Apresentam envelope viral de baixa eletrondensidade envolvendo cada capsídeo, que se mostra com média eletrondensidade e delimita o material genético, bastante eletrondenso, em seu interior (fig.2A,B).

Em corte transversal, os vírus apresentam-se de hexagonais a redondos, com 0,05  $\mu\text{m}$  de diâmetro (fig.2A), enquanto em corte longitudinal apresentam-se em forma de bastão, com, aproximadamente, 0,2  $\mu\text{m}$  de comprimento (fig.2B).

Hemócitos associados às células epiteliais apresentam vírus em vacúolos e vesículas (fig.2C).

## Discussão

A comparação morfológica dos vírus encontrados em *Polistes versicolor*, com os entomopatógenos conhecidos nos levam a família Baculoviridae, mais especificamente ao gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). Estes são caracterizados pelo formato de bastão do capsídeo, medindo de 0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$

de comprimento e 0,03 a 0,06  $\mu\text{m}$  de diâmetro (SUDHAKAR e MATHAVAN, 1999; ARIF, 1986), o que coincide com nossos dados.

Segundo Riegel e Slavicek (1997), os NPVs apresentam dois estágios morfológicamente distintos durante seu ciclo. Após a infecção, a forma desencapsulada do vírus é liberada, sendo chamado “*budded vírus*”, responsável pela infecção de outras células. Na última fase da infecção é produzida a segunda forma do vírus, a encapsulada, chamada de poliedro. Esta última é a responsável pela infecção de inseto para inseto (progressão horizontal). Nas células epiteliais de *P. versicolor* os vírus encontram-se na forma desencapsulada. Todavia, por encontrarem-se agrupados e haver muito estroma viral, pode se tratar de uma fase precedente à formação do poliedro. Da mesma forma, Silveira *et al.* (2003), observou hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* 72hrs horas após a infecção com vírus agrupados e estroma desenvolvido, que logo após convertiam-se em poliedros.

A ocorrência de NPV em insetos adultos ainda é pouco conhecida, principalmente por estes não apresentarem sintomas quando infectados (STEINHAUS, 1949). Gama (1985) apresenta micrografias onde se nota a presença de partículas virais em glândulas pós-faríngea e mandibulares da formiga *Camponotus rufipes*, semelhantes àquelas agora encontradas em *P. versicolor*. Todavia estas estruturas são interpretadas pelo autor como acúmulos de secreção em arranjo cristalino.

As alterações morfológicas observadas nas células epiteliais infectadas condizem com aquelas descritas para células infectadas do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (MATOS *et al.*, 1999).

A via de infecção mais comum em larvas de Lepidoptera é a ingestão do poliedro que, ao passar pelo meio alcalino do intestino médio do hospedeiro, sofre solubilização do envelope, dando origem à forma desencapsulada (GRANADOS, 1980 *apud* MATOS, 1999). Entretanto o pH alcalino parece ser exclusivo de insetos herbívoros. Os Hymenoptera (Apocrita) apresentam pH do intestino médio variável de acordo com o alimento, mas sempre ácido (CHAPMAN, 1998). Logo a contaminação das vespas não deve ser pela ingestão do poliedro, pois não haveria a desencapsulação.

Segundo Carpenter e Marques (2001) *P. versicolor* é predadora de muitas larvas de Lepidoptera, sendo estas hospedeiras em potencial de Baculovírus. Fouillaud e Morel (1994) e Morel e Fouillaud (1994) encontraram em ninhos de *P. hebreus* grande quantidade de baculovírus, provenientes de suas presas, as larvas de Lepidoptera. A captura destas larvas para alimentação do adulto é rara entre as vespas. Na maioria das vezes estas são maceradas e entregues às larvas de seu ninho (HUNT, 1991). Porém, vespas adultas são capazes de ingerir alimentos líquidos ou semilíquidos (SPRADBERY, 1973), onde Hunt (1991) demonstrou que *Polistes* ingerem parte da hemolinfa das presas durante a maceração. Não é raro, entretanto, encontrar material particulado no papo e ventrículo destas vespas.

De acordo com Summers (1971), Kawanishi *et al.* (1972) e Horton e Burand (1993) o epitélio do intestino médio é o primeiro tecido infectado. Entretanto Engelhard *et al.* (1994), Barret *et al.* (2000) e Matos *et al.* (1999) mostraram infecções de tecidos associados à membrana basal e hemócitos, além de traqueoblastos, epiderme, corpo gorduroso e músculos, mostrando a capacidade do vírus de infectar diferentes tipos celulares. Em *P. versicolor*, além das células epiteliais, hemócitos associados a estas células também foram observados portando vírus.

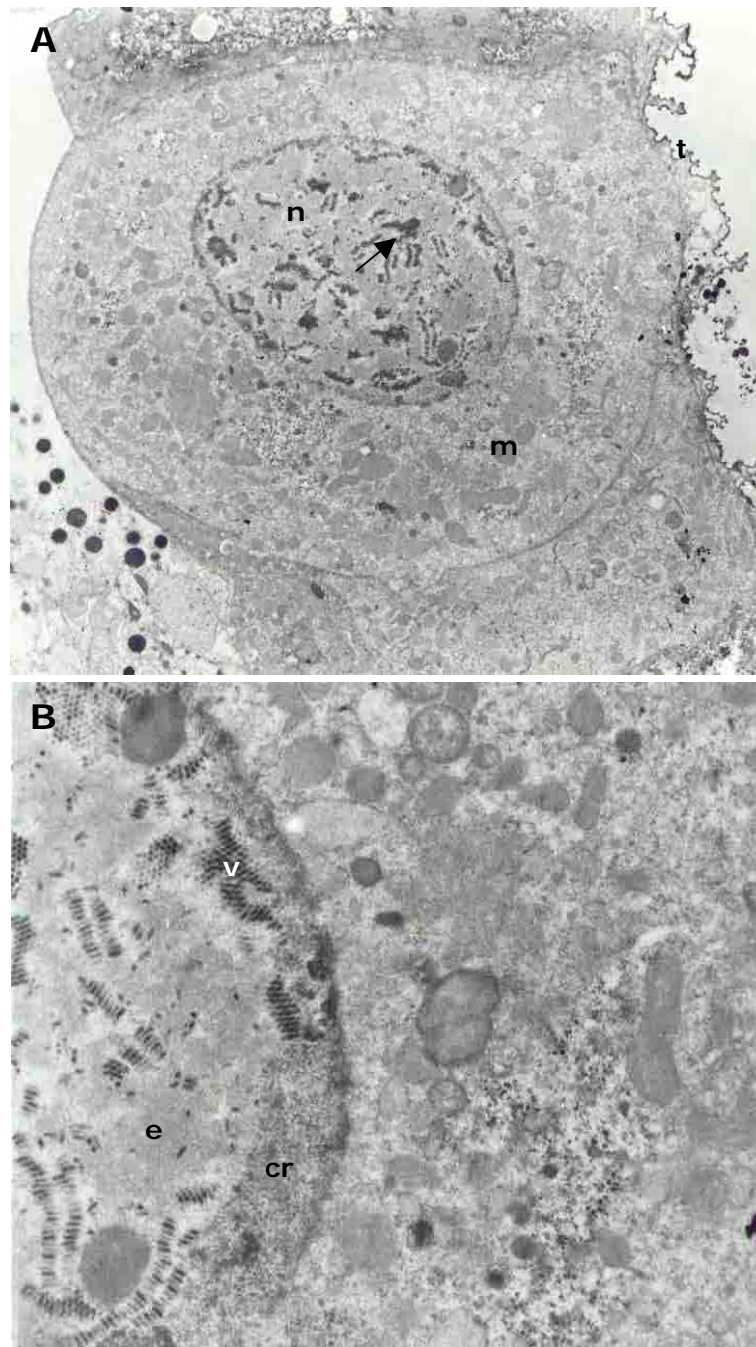
Isto posto, nossa proposição é de que forrageiras de *P. versicolor* ao coletar lagartas infectadas, ingerem a forma desencapsulada do vírus, presente na hemolinfa da presa. Esta forma do vírus, capaz de infectar diferentes células de um hospedeiro, invade as células do epitélio do intestino médio da vespa, quando ingerido. Uma vez nestas células, o vírus se instala no núcleo e inicia a replicação, produzindo novos vírus que, lançados na hemolinfa, infectam hemócitos e outros tecidos, entre eles o epitélio mandibular.

Apesar dos NPVs serem muitas vezes descritos como específicos para uma espécie hospedeira, para alguns NPVs bem estudados já foram reconhecidos mais de 30 possíveis hospedeiros (GRÖNER, 1986 *apud* MATOS, 1999), o que demonstra sua capacidade de infectar diferentes espécies. Além do mais, a muito se sabe da facilidade com que ocorrem

mutações em vírus (STEINHAUS, 1949), sendo este um caminho para o surgimento de novas espécies capazes de infectar diferentes hospedeiros.

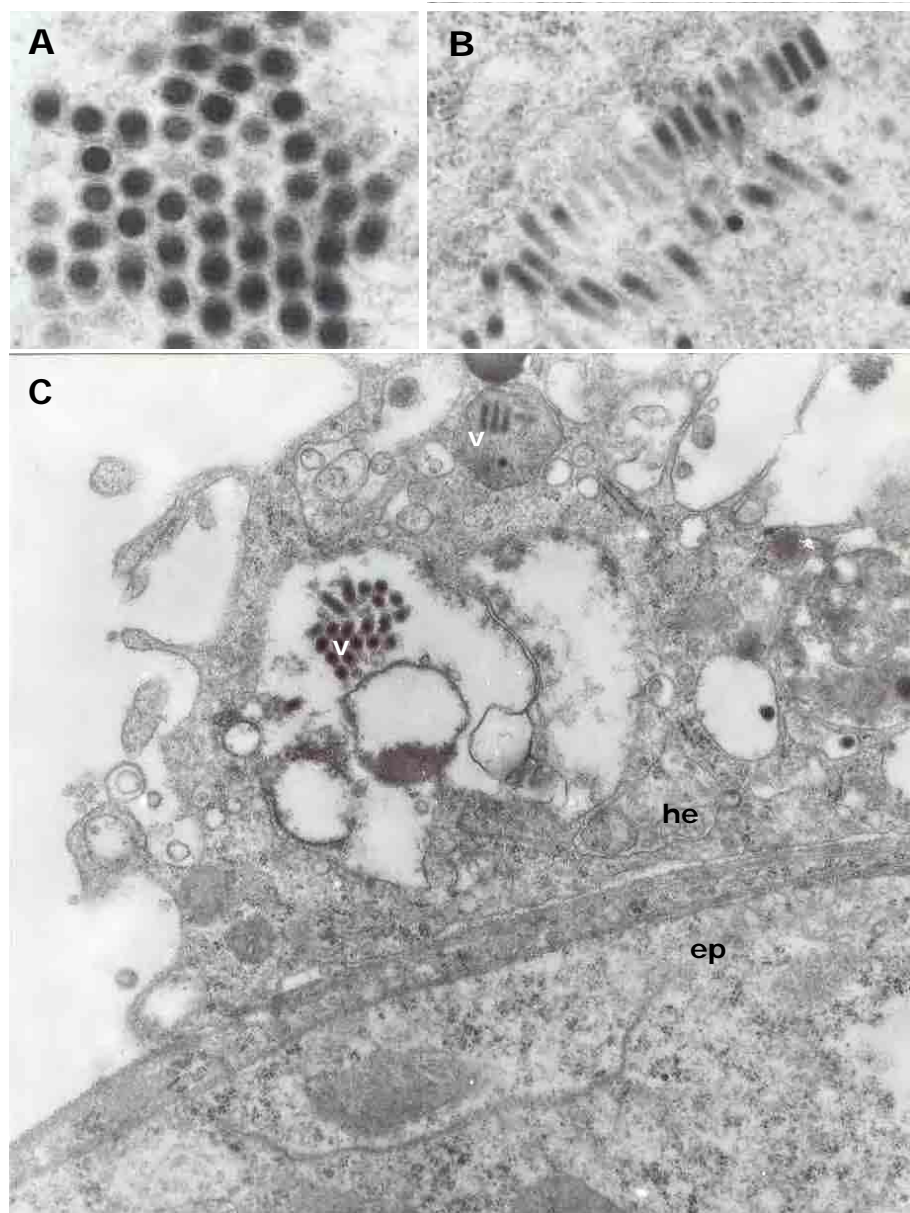
Por fim, o vírus presente no indivíduo coletado, aparentemente não o afetava, pois foi coletado de um ninho em grande atividade. Todavia, tais informações ainda não são suficientes para interpretar tal fato como resistência ao vírus, infecção assintomática ou apenas início do processo de infecção.

## Documentação fotográfica



**Figura 1** Micrografias de células infectadas do epitélio mandibular de *P. versicolor*, onde pode-se observar em A o núcleo hipertrofiado (n) com grupos de vírus (setas), citoplasma rico em mitocôndrias (m) e uma traquéia (t) próxima (4050x). Em B temos um detalhe do núcleo com inúmeras partículas virais (v) dispostos em grupos ou isolados, imersos no estroma viral (e) e a cromatina da célula condensada na periferia do núcleo (cr) (10250x).





**Figura 2** Em A e B observa-se os *Nucleopolyhedrovirus* em corte transversal e longitudinal, respectivamente, onde nota-se o envelope viral de baixa eletrondensidade envolvendo cada capsídeo, que se mostra com média eletrondensidade e delimita o material genético, bastante eletrondenso, em seu interior (155000x e 67500x, respectivamente). Em C observa-se um hemócito (he) ligado à célula epitelial (ep), carregando vírus (V) no interior de vacúolo e vesícula (21000x).

## Bibliografia

- ARIF, B. M. The structure of the viral genome. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 131, p. 21-29, 1986.
- BARRET, J. W.; LADD, T. R.; PRIMAVERA, M. J.; RETNAKARAN, A.; SOSHI, S. S.; PALLI, S. R. Nucleopolyhedrovirus pathology in spruce budworm larvae. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 132, n. 5, p. 581-90, 2000.
- CARPENTER, J. M.; MARQUES, O.M. Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta, Hymenoptera, Vespoidea, Vespidae). Série publicações digitais. v.2, 2001.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- ENGELHARD, E. K.; KAM-MORGAN, L. N. W.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America. Biological Science**, Washington, v. 91, p. 3224-3227, 1994.
- FOUILLAUD, M.; MOREL, G. Characterization of cytoplasmic and nuclear polyhedrosis viruses recovered from the nest of *Polistes hebreus* F. (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 64, n. 2, p. 89-95, 1994.
- GAMA, V. Sistema salivar de *Camponotus (Myrmotherix) rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, n. 45, v. 3, p. 317-59, 1985.
- GIANNOTTI, E. **Estudos biológicos e etológicos da vespa social neotropical *Polistes (Aphanilopterus) lanio lanio***. Tese (Doutorado em Zoologia). UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1992.
- GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor***. Tese (Doutorado em Genética), USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1977
- GRANADOS, R. R. Infectivity and mode of action of baculoviruses. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 22, p. 1377-1405, 1980.
- HARRAP, K. A.; PAYNE, C. C. The structural properties and identification of insect viruses. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 25, p. 273-355, 1979.
- HORTON, H. M.; BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, Washington, v. 67, p. 1860-1868, 1993.

- HUNT, J. H. Nourishment and the evolution of the social Vespidae. In: ROSS, K.G.; MATTHEWS, R.W. (Org.) **The Social Biology of Wasps**. New York: Cornell University Press, p. 540-569, 1991.
- KAWANISHI, C. Y.; SUMMERS, M. D.; STOLTZ, D. B.; ARNOTT, H. J. Entry of insect virus in vivo by fusion of viral envelope and microvilli membrane. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 20, p. 104-108, 1972.
- MATOS, T. G. T.; GIUGLIANO, L. G.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 28, p. 195-201, 1999.
- MOREL, G.; FOUILLAUD, M. Persistence of occluded viroses in the nest of the paper wasp *Polistes hebreus* (Hym, Vespidae). **Entomophaga**, Paris, v. 39. n. 2, p. 137-47, 1994.
- RIEGEL, C. I.; SLAVICEK, J. M. Characterization of the replication cycle of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 51, p. 9-17, 1997.
- SILVEIRA, E. B.; CORDEIRO, B. A.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Ultrastructural analysis of *Anticarsia gemmatalis* M Nucleopolyhedrovirus infection in larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). In: CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 19., 2003, Caxambu. **Proceedings...** Caxambu, 2003. 1 CD-ROM.
- SPRADBERY, J. P. **Wasps - An account of the biology and natural history of solitary and social wasp**. Washington: University of Washington Press. 1973
- STEINHAUS, E. A. **Principles of the insect pathology**. New York: McGraw – Hill. 1949.
- SUDHAKAR, S.; MATHAVAN, S. Electron microscopical studies and restriction analysis of *Helicoverpa armigera* nucleo polyhedrosis virus. **Bioscience Journal**, Washington, v. 24, n. 3, p. 361-70, 1999.
- SUMMERS, M.D. Electron microscopy observations on granulovirus entry, uncoating, and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, v. 35, p. 606-625, 1971.
- TINSLEY, T. W.; HARRAP, K. A. Viruses of invertebrates. **Comprehensive Virology**, New York, v. 12, p. 1-101, 1978.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Polistes versicolor* está entre as espécies de vespa melhor estudadas até agora. No capítulo 1 o comportamento desta espécie foi levantado, em duas diferentes fases do desenvolvimento colonial, a pós-emergência e o final de ciclo. Apesar de não ser um trabalho inédito, pudemos contribuir com a inclusão de novos atos comportamentais no repertório desta espécie, além de comparar técnicas de observação e analisar, sob um aspecto diferente do encontrado na literatura, os estágios do desenvolvimento da colônia. Assim, quanto ao comportamento pudemos concluir que:

- *P. versicolor* realiza 43 categorias comportamentais, agrupadas em 6 classes distintas, todas muito semelhantes ao observado por outros autores para esta mesma espécie.
- As colônias em pós-emergência apresentam 3 grupos funcionais de indivíduos, a dominante (apenas 1 indivíduo), as subordinadas ativas e as pouco ativas, os quais são nitidamente distinguíveis quanto maior for o número de indivíduos na colônia e o tempo de observação.
- Em colônias formadas por poucos indivíduos, o grupo das subordinadas pouco ativas é suprimido, havendo apenas a dominante e as subordinadas ativas (operárias).
- As subordinadas pouco ativas são basicamente os indivíduos imaturos, muito velhos e/ou aqueles de alta posição hierárquica.

- Há especialização comportamental momentânea em *P. versicolor*.
- Nas colônias em final de ciclo distinguem-se 3 grupos de indivíduos, como na colônia em pós-emergência, porém com variação no número de indivíduos que constituem cada grupo.
- As colônias de *P. versicolor* são sempre monogínicas, mesmo no final de ciclo, quando há grande número de indivíduos com potencial para dominante.
- O aumento do número de possíveis dominantes desestrutura a organização funcional da colônia, pela redução do grupo de subordinadas ativas, forçando os indivíduos a abandonarem a colônia mãe e fundar suas próprias colônias.
- As subordinadas no final de ciclo reduzem seu repertório de atividades, apresentando apenas alguns poucos comportamentos para manutenção dos adultos da colônia.
- Não há investimento na produção ou manutenção das crias, no final de ciclo.
- Apenas os indivíduos mais velhos, entre as subordinadas, ainda se mantêm ativos, quanto à manutenção da colônia, por apresentarem limitações físicas para deixar a posição de subordinadas.
- Não há especialização comportamental, mesmo que momentânea, entre os indivíduos das colônias em final de ciclo
- Observações contínuas possibilitaram a observação de especializações momentâneas e comportamentos raros. Já observações descontínuas propiciaram uma visão panorâmica da organização funcional da colônia

Os machos de vespas despertam grande interesse por apresentarem aspectos de sua vida, anatomia e fisiologia ainda pouco conhecidos. Por não serem comumente encontrados, a possibilidade de estudá-los em uma das colônias observadas, nos permitiu reunir dados suficientes para confecção de um capítulo só para eles. Assim, apresentamos as seguintes conclusões tiradas da análise comportamental dos machos de *P. versicolor*:

- O tempo de permanência dos machos no ninho variou de 1 a 5 dias, sendo que o abandono do ninho ocorre independentemente da idade.
- Os machos de *P. versicolor* realizam 21 atos comportamentais diferentes.

- Não há relação clara entre a realização de determinados comportamentos com a idade.
- Machos passam a maior parte do tempo imóveis, consomem muito alimento e, apesar de auxiliarem na manutenção do ninho e cuidado com a cria, a frequência com que o fazem é mínima, quando comparado às fêmeas subordinadas.

O papel que as glândulas exócrinas desempenham na vida social dos insetos é imenso, uma vez que a comunicação e o controle das interações entre os membros de uma colônia, é mediado por compostos químicos sintetizadas por tais glândulas. Neste contexto, as glândulas, apesar de apresentarem funções variadas, podem impor limitações ou ditar a seqüência de atos que um determinado indivíduo irá desenvolver. O estudo das glândulas exócrinas em vespas ainda é limitado, mas já demonstra sua importância para compreensão da biologia dos vespídeos e até dos processos que levaram a evolução do comportamento social nos insetos. Buscando contribuir ainda mais com estas áreas, apresentamos as conclusões obtidas do estudo histoquímico da glândula ectomandibular de *P. versicolor*, comparado com a idade, comportamento e casta de cada indivíduo.

- A glândula ectomandibular (GEM) de *P. versicolor* apresenta lipídios, proteínas, glicoconjugados neutros e ácidos nucleicos, no citoplasma das células secretoras, como componentes estruturais ou intermediários do processo de síntese.
- As células secretoras da GEM não apresentam glicogênio armazenado.
- A secreção contida nas vesículas, presentes no citoplasma, e a observada na luz do reservatório apresenta lipídios, proteínas e glicoconjugados neutros.
- Há uma marcante variação interindividual quanto a concentração dos compostos constituintes da secreção e a quantidade de vesículas de secreção presentes no citoplasma das células secretoras, sendo tais variações independentes da idade, casta ou comportamento do indivíduo.

- Os principais componentes variáveis, na composição da secreção da GEM, foram proteínas básicas e lipídios, estando os demais elementos sempre presentes, variando pouco e apenas quanto a intensidade da reação.
- A principal variação interindividual do padrão histoquímico da GEM está nos indivíduos de colônias com pequeno número de formas imaturas (início da pós-emergência e final do declínio).
- Colônias com grande número de imaturos (larvas e pupas) e hierarquia bem estabelecida apresentam os indivíduos com padrão histoquímico da secreção da GEM bastante semelhantes.
- Não há presença de polissacarídeos sulfatados e carboxilados (ácidos) na secreção ou nas células da GEM.

Fechando o ciclo das células secretoras da glândula ectomandibular de *P. versicolor* pudemos notar características que indicavam a presença de morte celular programada. No intuito de descrever o estágio final do ciclo secretor da GEM, avançando mais um passo na compreensão de sua função, dos processos de síntese e desenvolvimento desta glândula, apresentamos as conclusões do estudo histoquímico e ultra-estrutural da morte celular em glândulas ectomandibulares de *P. versicolor*.

- Não há divisão das células (mitose) que compõem a glândula ectomandibular, após a emergência.
- A glândula ectomandibular de *P. versicolor* apresenta-se em franca atividade nos primeiros dias de vida, sofrendo alterações ao longo do tempo de vida, que culminam na morte da célula.
- Os primeiros dias após a emergência são caracterizados como a fase de maior atividade nuclear das células secretoras.
- Por volta de 20 dias após a emergência inicia-se o acúmulo de vesículas de secreção na região central da célula.
- Após 25 dias da emergência do indivíduo, as células secretoras passam a apresentar sinais de morte celular programada.

- Indivíduos com 50 dias ou mais já apresentam células secretoras com características que inviabilizam suas atividades, tais como a vacuolização total do citoplasma e formação de vacúolos autofágicos e figuras mielínicas.
- O nucléolo encontra-se presente durante todo processo, havendo inclusive a presença de muito RNA no citoplasma, mesmo nas fases finais.
- Os vacúolos formados no final do ciclo apresentam-se preenchidos por glicoconjugados neutros.
- As células do reservatório também apresentam características de morte programada, porém com certas diferenças em relação a célula secretora.
- A morte programada das células da GEM de *P. versicolor* apresenta características de apoptose, necrose e morte celular vacuolar, não se enquadrando aos modelos já descritos, mas guardando muitas semelhanças com processos de morte celular programada observados em outros invertebrados, sugerindo ser, talvez, um novo tipo morfológico.
- Não há sincronismo quanto aos estágios do desenvolvimento e morte entre as células secretoras da mesma glândula.

Durante o estudo ultra-estrutural da glândula ectomandibular nos deparamos com uma infecção viral em células epiteliais próximas à glândula ectomandibular, fato raro e pouco reportado. Desta forma, fechamos esta tese com o capítulo 5, onde descrevemos esta infecção, discutindo sua origem e processos, contribuindo assim para o estudo de patologias em vespas adultas. Deste estudo concluímos:

- Os vírus envolvidos neste processo pertencem a família Baculoviridae, mais especificamente ao gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV).
- Os vírus são, provavelmente, provenientes de suas presas, lagartas de Lepidoptera.
- A forma de infecção mais provável deve ter sido a ingestão da forma desencapsulada do vírus.
- Células epiteliais e hemócitos são infectados pelo vírus.



- As células infectadas apresentam alterações morfológicas, tornando-se hipertrofiadas e com núcleo tomado pelos vírus.

Assim, com os dados desta tese vindo somar conhecimento aos resultados dos vários trabalhos já publicados com esta espécie, propomos que a vespa *Polistes versicolor* seja considerada um modelo para o estudo de vespas primitivamente eussociais neotropicais, uma vez que apresenta ampla distribuição na América do Sul, possui o comportamento e ciclo de vida conhecidos e boa parte dos aspectos de sua anatomia interna e externa bem estudados. Além dos dados referentes a sua biologia encontrarem-se amplamente elucidados, esta espécie pertence a um gênero cosmopolita, considerado por alguns autores como chave na compreensão dos processos que levaram a evolução do comportamento social, constituindo um modelo ideal no estudo das vespas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITTO, F. B.; CAETANO, F. H.; MORAES, R. L. M. S. Comparative analysis of morphological, structural and morphometric patterns of *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera, Vespidae) hypopharyngeal glands. **Neotropical Entomology**, Curitiba, v. 33, n. 3, p. 321-326, 2004.
- BRITTO, F. B.; CAETANO, F. H. Ultramorphology analysis of the venom glands and their histochemical relationship with the convoluted glands in the primitive social paper wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). **The Journal of Venemous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. Botucatu, v. 11, n. 2, p. 160 – 174, 2005.
- CARNEIRO SILVA, A. **Determinação do sistema de substituição de fêmeas dominantes em colônias de *Polistes* (Vespidae - Polistinae)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1991.
- CONTE, H.; CRUZ-LANDIM, C. Scanning Electron Microscopy of the Mandibular Gland of *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 1, p. 147-150, 1997.
- DEL LAMA, M. A.; FERREIRA, K. M. genetic characterization of the peptidases of *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). **Braz. J. Biol.** São Paulo, v. 63, n. 2, p. 1-10, 2003.
- DOWNING, H. A. The function and Evolution of Exocrine Glands. In: ROSS, K. G.; MATTHEWS, R. W. (Org.). **The Social Biology of Wasps**. New York: Cornell University Press, 1991. p. 540-569.
- EDWARDS, R. **Social Wasps - Their Biology and Control**. East Grinstead: Rentokil Limited, 1980.
- EVANS, H. E; WEST-EBERHARD, M. J. **The Wasps**. An Arbor: University of Michigan Press. 1970.
- FORTUNATO, A.; TURILLAZZI, S.; DELFINO, G. Ectal mandibular gland in *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae): ultrastructural modifications over the secretory cycle. **Journal of Morphology**, Michigan, v. 244, p. 45-55, 2000.
- FORTUNATO, A.; MAILE, R. TURILLAZZI, S.; MORGAN, E.D.; MONETI, G.; JONES, G. R.; PIERACCINI, G. Defensive role of secretion of ectal mandibular glands of *Polistes dominulus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n. 3, p. 569-579, 2001.
- GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor***. Tese (Doutorado em Genética). USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1977.

- GONZALES, J. M.; PIÑANGO, J.; BLANCO, E.; MATTHEWS, R. W. On the mass aggregations of *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) along the northern cordillera of Venezuela, South America. **Journal of Hymenoptera Research**. New York, v. 14, n. 1, p. 15-21, 2005.
- MAULE-RODRIGUES, V. **Estudo sobre vespas sociais do Brasil (Hymenoptera, Vespidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Rio Claro, 1968.
- PIETROBON, T. A. O.; CAETANO, F. H. Histochemistry of the ectal mandibular gland of *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). A study for different castes in post-emerged colonies. **Acta Microscópica** (suplem.), Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Micro-análise, Águas de Lindóia, 2001.
- PIETROBON, T. A. O.; CAETANO, F. H. Ultramorphology e histology of the ectal mandibular gland in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae). **Cytologia**, Tokio, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2003.
- PIETROBON, T. A. O.; CAETANO, F. H. Ultrastructure of the ectal mandibular gland of the paper wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). **Brazilian Journal of Morphological Science**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 5-12, 2004.
- ROCHA, T. **Caracterização histoquímica e determinação do ciclo secretor da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2004.
- ROCHA, T.; CAETANO, F. H. Ultramorphology and histology of the *Polistes versicolor* (Olivier) (Vespidae) thorax salivary gland compared with other Hymenoptera. **Neotropical Entomology**, Curitiba, v. 32, n. 2, p. 585-590, 2003.
- ROCHA, T.; CAETANO, F. H. Ultrastructure of the thoracic salivary glands of *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae). **Brazilian Journal of Morphological Science**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 59-64, 2004.
- SILVA DE MORAES, R. L. M. **Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. Tese (Livre-Docência), UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1998.
- SINZATO, D. M. S.; PREZOTO, F. Aspectos comportamentais de fêmeas dominantes e subordinadas de *Polistes versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae) em colônias na fase de fundação. **Revista de Etologia**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 121-127, 2000.
- SOUZA, G. M. C. **Estudo da idade e das condições morfofisiológicas influenciando o peso corporal de fêmeas adultas de *Polistes versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae)**. Dissertação

(Mestrado em Zoologia), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 1998.

VALADÃO, R. **Dados sobre a interação prole-adulto em *Polistes versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia). UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1986.

WENZEL, J. W. Male reproductive behavior and mandibular glands in *Polistes major* (Hymenoptera: Vespidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 34, n. 1, p. 44-57, 1987.

ZARA, J. F.; BALESTIERI, J. B. P. Behavioural catalogue of *Polistes versicolor*. Post emergent colonies (Vespidae: Polistinae). **Naturalia**, São Paulo, v. 25, p. 301-319, 2000.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



GLÂNDULA ECTOMANDIBULAR E  
COMPORTAMENTO DE *Polistes versicolor*  
(OLIVIER) (HYMENOPTERA, VESPIDAE).

Rio Claro, 19 de agosto de 2005

---

Thiago A. Ortega Pietrobon  
Doutorando

---

Dr. Flávio Henrique Caetano  
Orientador

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)